

3 讨 论

珠蛋白生成障碍性贫血是中国南方危害最大的遗传病之一,发病率全球第 3。 α 珠蛋白生成障碍性贫血是由于位于 16 号染色体上的 α 珠蛋白基因缺失或突变使 α 珠蛋白合成受抑制,造成 α 链减少,过剩的 β 链在红细胞内沉积,使红细胞变形性降低,红细胞破坏增多。 β 珠蛋白生成障碍性贫血是由于位于 11 号染色体上的 β 珠蛋白基因突变导致 β 珠蛋白合成受抑制,过剩的 α 链在红细胞内沉积导致红细胞过度被破坏。

本研究显示莆田市 α 珠蛋白生成障碍性贫血基因构成前 3 位是-SEA、- α 3.7、- α 4.2,这与我国广东、广西、四川、重庆等地报道一致^[1-4]。莆田市 β 珠蛋白生成障碍性贫血基因构成前 3 位分别是 IVS-II-654/N、CD41-42/N 和 CD17/N。国内其他地区 β 珠蛋白生成障碍性贫血的主要 3 种基因型也相同,但是在排序上有不同,体现出 β 珠蛋白生成障碍性贫血较 α 珠蛋白生成障碍性贫血有更明显的地区差异性和遗传异质性。同时发现在福建省内,IVS-II-654/N 是最主要的 β 珠蛋白生成障碍性贫血基因型^[5-7]。

本次研究发现在疑似携带者中珠蛋白生成障碍性贫血的检出率为 47.2%,很大比例的疑似携带者珠蛋白生成障碍性贫血基因检测为阴性。原因有:(1)是本次珠蛋白生成障碍性贫血血筛查主要手段为血常规检测,判断筛查阳性的标准为血红蛋白(Hb)<110 g/L,红细胞平均血红蛋白量(MCH)<27 pg,红细胞平均体积(MCV)<80 fL。符合这种血常规结果的疾病不只有珠蛋白生成障碍性贫血,还有缺铁性贫血、铁粒幼细胞贫血、慢性病贫血等。(2)是检测范围有限,只能检测已知基因型,少见或未知基因型不能检出。Galehdari 等^[8]用基因测序技术在伊朗发现 42 种 β 珠蛋白生成障碍性贫血基因型,远高于本研究采用方法所能检测的 15 种基因型。基因测序技术能检测更多的珠蛋白生成障碍性贫血基因型,但是实验要求条件高,检测费用高,目前还难以在临床广泛使用。

本次研究病例中,进行珠蛋白生成障碍性贫血基因检测的人群主要是育龄妇女和儿童,成年男性和老年男女性较少。由此可见,经过多年在妇幼保健系统中的推广及经验交流,妇产

• 临床研究 •

科医生和儿科医生对血常规存在异常的病例警惕性较高。由于没有莆田市珠蛋白生成障碍性贫血方面的流行病学调查数据支持,其他普通专科医生的珠蛋白生成障碍性贫血防治观念淡漠。珠蛋白生成障碍性贫血预防相关知识急需进一步普及和推广,以减少珠蛋白生成障碍性贫血的漏诊。

参考文献

[1] 刘富华,贾艺聪,陈洁晶,等. 广西地区 13 589 例地中海贫血筛查结果及基因突变类型分析[J]. 临床血液学杂志, 2015,28(6):966-969.

[2] 杜丽,尹爱华,张彦,等. 2171 例地中海贫血产前基因诊断回顾性分析[J]. 国际妇产科学杂志, 2012,39(2):208-210.

[3] 杜伟,欧阳小峰,甘承文,等. 重庆地区 8 024 例地中海贫血筛查结果及地贫基因型分析[J]. 重庆医科大学学报, 2014,39(5):694-697.

[4] 王霞,江虹,贾劲,等. 四川地区人群地中海贫血的筛查及基因分析[J]. 生物医学工程学杂志, 2011,28(1):135-137.

[5] 成明,李健,郭奇伟,等. 厦门地区 3 715 例地中海贫血基因检测结果分析[J]. 中国妇幼保健, 2015,30(12):1870-1872.

[6] 黄海龙,徐两蒲,林娜,等. 福州地区 153 例地中海贫血基因突变类型、频率及产前诊断研究[J]. 海峡预防医学杂志, 2009,15(4):1-3.

[7] 吴琦瑛,周裕林,江雨,等. 厦门地区 β 地中海贫血基因突变类型及产前基因诊断研究[J]. 中国优生与遗传杂志, 2007,15(12):25-26.

[8] Galehdari H, Salehi B, Azmoun S, et al. Comprehensive spectrum of the β -Thalassemia mutations in Khuzestan, southwest Iran[J]. Hemoglobin, 2010,34(5):461-468.

(收稿日期:2016-01-28 修回日期:2016-05-26)

骨髓细胞髓过氧化物酶染色质控体系的建立

蒋朝晖,邱先艳,余红岚[△]

(贵阳市第一人民医院检验科 550002)

摘 要:目的 探讨自制乙二胺四乙酸二钾(EDTA-K₂)抗凝正常外周静脉血片作为骨髓细胞髓过氧化物酶(MPO)染色阳性对照的可能性,初步建立 MPO 染色的质控体系。**方法** 选取 EDTA 抗凝的正常外周静脉血制成 200 张血片,分为不固定组和固定组(95%乙醇固定),每隔 15 d 各组取 10 张血片进行 MPO 染色,观察其阳性率和积分变化。**结果** 血片中 MPO 酶活性随着时间推移而减弱,经 95%乙醇固定后,其阳性率能维持 90 d 左右;而 MPO 阳性积分一直随时间推移而减低,且固定组与不固定组差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 可选用自制 EDTA-K₂ 抗凝正常外周静脉血片经 95%乙醇固定后作为 MPO 染色的阳性对照,其有效期约为 90 d。

关键词:骨髓细胞; 髓过氧化物酶染色; 外周静脉血; 阳性对照; 质控体系

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2016.15.041 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2016)15-2155-03

目前临床主要依靠骨髓细胞形态学(M)、细胞免疫学(I)、细胞遗传学(C)和分子生物学(M)联合方法(MICM 分型)对白血病进行诊断和分型^[1]。但部分基层医院受到设备及技术水平的限制,对于白血病的初步诊断还主要依靠形态学。由于

[△] 通讯作者, E-mail:123900828@qq.com。

白血病细胞的异质性和多态性,加上阅片人员的经验及水平差异,形态学判断符合率较低(64%~77%),但结合细胞化学染色后,其符合率能提高至 86%左右^[2-3]。常规或电镜下的骨髓细胞髓过氧化物酶(MPO)染色对辅助判断急性白血病形态学具有重要价值,能初步区分髓系与非髓系^[4-5]。但在一些特殊病例中,比如 MPO 缺失患者^[6],或者个别急性淋巴细胞白血病患者骨髓中原幼淋巴细胞异常增生会抑制其他系统发育,有时会很难以见到成熟的粒细胞,即所谓的染色“内对照”很难找到,此时很难判断是真的阴性结果还是试剂失效或操作失误,因此引入质控物尤其是阳性对照对结果判读至关重要。由于 MPO 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因素影响,主观性强,很难实现标准化。现有报道多集中在 MPO 与疾病的相关性,而对于 MPO 染色实验本身质量控制的报道少见,本研究拟利用自制抗凝外周血片作为阳性对照,摸索其保存时间及保存条件,探讨其作为 MPO 染色阳性对照的可行性,初步建立 MPO 染色的质控体系。

1 材料与方法

1.1 材料 所有标本均来源于贵阳市第一人民医院门诊患者;主要试剂:MPO 染色试剂(联苯胺法,珠海贝索生物技术有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 选取合适的静脉血制成血片 选取的阳性对照血片细胞组成:白细胞 $9.2 \times 10^9/L$,中性粒细胞占 60%、淋巴细胞占 34%、单核细胞占 5%、嗜酸性粒细胞占 1%。制成血片 200 张,取一半用 95%乙醇固定,即分为固定组与不固定组。

1.2.2 MPO 染色 染色步骤严格按照试剂说明书进行:涂片干燥后,滴加联苯胺液数滴(覆盖血膜),再滴加 H_2O_2 数滴(两者比例 1:1),室温孵育 5~10 min,蒸馏水冲洗 2 min;甩干,瑞姬氏染液与磷酸盐缓冲液 1:2 混合染色 3~5 min,流水冲洗,干后镜检。阳性反应呈棕黄色、蓝色至黑色颗粒。为了更准确反映其阳性程度,笔者参照中性粒细胞碱性磷酸酶染色积分判读标准对 MPO 阳性细胞进行积分:(-)0 分,细胞质中无阳性染色颗粒;(+)1 分,细胞质中含少量棕黄色颗粒;(++)2 分,细胞质中含中等量棕黄色颗粒、蓝色或黑色颗粒;(+++)+3 分,细胞质中含较多棕黄色、蓝色或黑色颗粒;(++++)+4 分,细胞质中或整个细胞覆盖黑色颗粒。根据以上判读标准,计数 100 个白细胞,记录其阳性率及积分。

1.2.3 摸索血片的保存条件 将制成的血涂片在相对稳定的环境(室温 20℃,相对湿度 40%)中遮光保存,每隔 15 d 各组取 10 张血片进行 MPO 染色,比较其 MPO 阳性率和积分的变化。

1.3 统计学处理 统计及图表制作使用 Excel2007 软件完成。MPO 阳性率及积分采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间多重比较采用 LSD-*t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 固定组及不固定组外周血 MPO 染色阳性率受时间影响情况 不固定组 MPO 酶活性能维持 60 d 左右,60 d 后阳性率逐渐下降($P < 0.05$);而经 95%乙醇固定后,其酶活性能维持更长时间达 90 d 左右。见图 1。

2.2 固定组及不固定组外周血 MPO 染色阳性积分受时间影响情况 固定组与不固定组 MPO 阳性积分随时间逐渐减低

($P < 0.05$),不固定组与固定组差异无统计学意义($P > 0.05$)。见图 2。

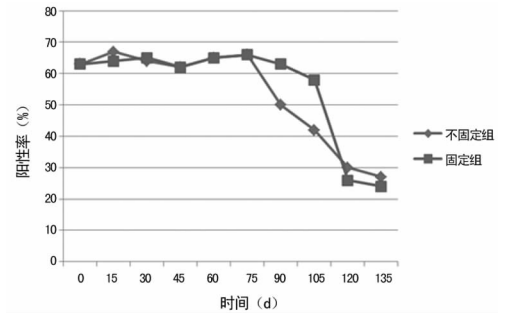


图 1 固定组与不固定组 MPO 阳性率比较

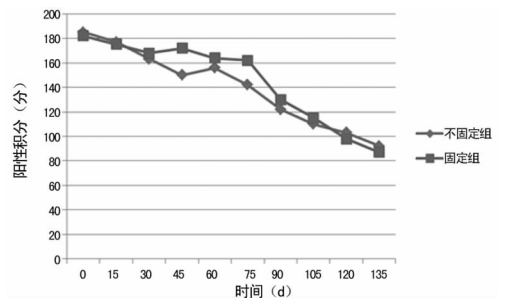


图 2 固定组与不固定组 MPO 阳性积分比较

3 讨论

MPO 是人体中性粒细胞含量最多的一种蛋白质,该酶是粒细胞进入循环之前在骨髓内合成并存在于嗜天青颗粒中的一种血红素蛋白酶,主要存在于中性粒细胞、单核细胞和某些巨噬细胞中^[7-9]。MPO 阴阳性或者其阳性强度对白血病的鉴别诊断具有重要价值,朱竑等^[2]报道 MPO 的阳性指数强弱顺序为 $M3 > M2b > M2a > M6 > M4 > M1 > M5 > ALL$ 。但目前 MPO 染色均由人工完成,联苯胺工作液有效期很短需要现配,阳性率会受到试剂有效期的影响;而阳性强度又与细胞数量、染色时间及环境温度息息相关;结果判读主观性强。因此,如果没有质控体系,很难保证 MPO 染色结果的精密度和准确性。

由于关于 MPO 染色实验本身质量控制的报道少见,本研究首次摸索了自制抗凝外周血片,探讨其作为 MPO 染色阳性对照的可行性,初步建立 MPO 染色的质控体系。本研究对阳性对照血片的保存条件和有效期进行了实验验证。实验发现:已知细胞组成的外周血(同时存在较多的中性粒细胞和淋巴细胞)在 20℃、40%湿度左右的环境中遮光保存,MPO 酶活性随着时间推移而减弱,经 95%乙醇固定后,其阳性率能维持 90 d 左右;而 MPO 阳性积分一直随时间推移而减低,且固定组与不固定组没有明显差异。在随后的工作中,将该质控品应用于标本检测,使用方便,也不存在试剂浪费,较好地起到了质控作用。

综上所述,批量制作已知细胞成分的外周血片,经 95%乙醇固定后,可作为 MPO 染色的阳性对照,其效期约为 90 d。今后的研究将集中在选择合适的固定剂或改变保存条件(低温)能否延长其效期;另外,由于中性粒细胞碱性磷酸酶、特异性酯酶同样存在于中性粒细胞中,同一份阳性对照能否同时应用于其他化学染色的实验中都有待实验验证。

参考文献

[1] Steven HS, Elias C, Nancy LH, et al. WHO classification of tumor of haematopoietic and lymphoid tissues[M]. 4 th ed. Geneva Switzerland: World Health Organization, 2008:14-36.

[2] 朱竑, 崔雯. 骨髓细胞化学染色对急性白血病分型的诊断意义[J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(17):2142-2143.

[3] 熊树民. 急性白血病 MICM 分型诊断[J]. 诊断学理论与实践, 2002, 1(2):76-78.

[4] 常军林, 巨小英. 髓过氧化物酶染色对急性白血病分型诊断的价值[J]. 吉林医学, 2014, 35(22):4925-4926.

[5] 刘芳, 向建平, 邹萍, 等. 电镜及免疫标记髓过氧化物酶检测对急性白血病分型诊断的意义[J]. 临床内科杂志, 2004, 21(2):115.

[6] 任继欣, 吴连杰, 冯燕. 白细胞髓系过氧化物酶缺失一例分析[J]. 临床误诊误治, 2015, 28(2):84-85.

[7] Arnhold J. Properties, functions, and secretion of human myeloperoxidase[J]. Biochemistry (Mosc), 2004, 69(1):4-9.

[8] 江雁, 穆红, 唐志琴, 等. 急性白血病系列特异性抗原表达分析[J]. 国际检验医学杂志, 2009, 30(6):532-534.

[9] 陈方平. 临床检验血液学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2006:55-57.

(收稿日期:2016-04-13 修回日期:2016-05-26)

• 临床研究 •

2013~2015 年铜绿假单胞菌下呼吸道感染的耐药性分析及变迁

林广城¹, 聂署萍^{2△}, 谭燕清¹, 黄烈²

(1. 广东省深圳市龙岗区第七(沙湾)人民医院检验科 518114; 2. 广东医学院附属深圳市福田人民医院检验医学部 518033)

摘要:目的 分析住院患者铜绿假单胞菌(PAE)在下呼吸道感染中的耐药性及变迁情况, 为临床合理使用抗菌药物提供科学依据。**方法** 收集 2013~2015 年住院患者下呼吸道标本分离的 444 株铜绿假单胞菌, 采用法国生物梅里埃 VITEK 2 Compact 细菌鉴定/药敏系统进行鉴定和药敏试验。**结果** 3 年铜绿假单胞菌的平均耐药率以阿米卡星、妥布霉素、庆大霉素最低(<9%), 其次是哌拉西林/他唑巴坦(13.52%)、头孢吡肟(18.02%)、左氧氟沙星(18.47%)、环丙沙星(20.50%)、哌拉西林(18.70%)、头孢他啶(19.82%)、美罗培南(24.10%)、亚胺培南(31.76%), 而头孢唑啉、氨苄西林、头孢呋辛、头孢替坦、氨苄西林/舒巴坦、复方磺胺甲噁唑、头孢曲松的耐药率均在 95% 以上, 多重耐药铜绿假单胞菌占 20%, 且对大部分抗菌药物的耐药率呈现逐年上升。**结论** 3 年间铜绿假单胞菌对大部分常用抗菌药物的耐药性呈现逐年上升趋势, 铜绿假单胞菌的多重耐药现象及对碳青霉烯类的耐药性日益严重, 应引起临床医生高度重视。临床应根据药敏试验和患者的个体情况科学、合理地使用抗菌药物, 从而提高疗效和减缓耐药菌的产生。

关键词:铜绿假单胞菌; 下呼吸道感染; 耐药性

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2016.15.042 文献标识码:A 文章编号:1673-4130(2016)15-2157-03

铜绿假单胞菌(PAE)是下呼吸道感染常见的致病菌之一, 不仅对多种抗菌药物有天然耐药性, 而且可通过各种机制产生多重耐药(MDR), 给临床治疗带来很大困难。为了解此菌临床抗菌药物的耐药性及其耐药变迁情况, 现对深圳市福田区人民医院 2013 年 1 月至 2015 年 12 月从下呼吸道标本分离的铜绿假单胞菌的耐药性进行回顾性分析。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 收集 2013 年 1 月至 2015 年 12 月深圳市福田区人民医院从下呼吸道感染住院患者的痰和支气管肺泡灌洗液分离到的铜绿假单胞菌 444 例, 去除同一患者前后分离的重复菌株。2013 年分离铜绿假单胞菌 142 株, 2014 年分离 150 株, 2015 年分离 152 株。标本的分离培养严格参照《全国临床检验操作规程(第 3 版)》^[1] 执行。质控菌株:铜绿假单胞菌(ATCC27853), 均由国家卫生和计划生育委员会临床检验中心提供。

1.2 细菌鉴定和药敏试验方法 采用法国生物梅里埃 VITEK 2 Compact 细菌鉴定/药敏系统进行鉴定和药敏试验,

鉴定卡用 GN 卡鉴定到种, 药敏卡使用 GN AST-09, 对 18 种药物进行敏感性试验。药敏试验判断按美国临床和实验室标准协会(CLSI)2009~2011 年新的折点标准判断药敏数据。

1.3 统计学处理 应用 WHONET5.4 软件进行统计分析。

2 结果

2.1 铜绿假单胞菌对常用的 18 种抗菌药物的耐药率 444 株铜绿假单胞菌对常用的 18 种抗菌药物的耐药率以阿米卡星、妥布霉素、庆大霉素最低(<9%), 其次是哌拉西林/他唑巴坦、头孢吡肟、左氧氟沙星、环丙沙星、哌拉西林、头孢他啶、美罗培南耐药率低于 30%, 亚胺培南耐药率为 31.76%, 耐药率较高的是头孢唑啉、氨苄西林、头孢呋辛、头孢替坦、氨苄西林/舒巴坦、复方磺胺甲噁唑、头孢曲松(耐药率均>95%)。见表 1。

2.2 多重耐药情况 对亚胺培南、环丙沙星、头孢他啶 3 种药物同时耐药的菌株为多重耐药铜绿假单胞菌, 444 株铜绿假单胞菌中多重耐药约占 20%。

△ 通讯作者, E-mail: nieping2@126.com。