

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2018.16.006

疟原虫厚血膜制作和染色的最佳条件分析*

张文萍¹, 张秋萍², 李冬玲¹, 张仲明¹, 杨燕梅¹, 罗燕婷¹, 单万水^{1△}

(1. 广东省深圳市第三人民医院检验科 518114; 2. 广东省深圳市罗湖区妇幼保健院妇产科 518019)

摘要:目的 探讨疟原虫厚血膜制作和染色的最佳条件。方法 分别取 3.0、4.0、5.0 μL 的外周血标本制成 0.8、1.0、1.2 cm 的厚血膜,参照厚血膜制片的标准评分系统进行评分,选出得分最高者为厚血膜的制作方法;常规实验室条件下,将姬姆萨染液和配套缓冲液分别按 1:19、1:9、3:7、2:8 的比例稀释配制,染色时间分别为 10、20、30、40 min,参照厚血膜染色的标准评分系统进行评分,以得分最高者为染色的最佳方法。结果 直径 1.0 cm 的厚血膜得分较高集中在用量 4.0 μL 和 5.0 μL ,用量为 4.6 μL 得分最高的比例占最多,被推荐为制作厚血膜的最佳方法;疟原虫厚血膜的最适染液浓度和最适染色时间分别为 3:7 稀释、染色 10 min 和 1:9 稀释、染色 30 min 得分最高级“A”的比例为最多,均能达到优良的染色效果。结论 制作诊断疟原虫厚血膜的最佳用量为 4.6 μL ,相应的最佳直径为 1.0 cm,以 3:7 稀释、染色 10 min 和 1:9 稀释、染色 30 min 均能达到最佳染色效果,便于识别疟原虫虫体,提高了检出率,可以在常规试验条件下推广应用。

关键词:疟原虫; 厚血膜; 姬姆萨染色**中图分类号:**R378.3**文献标志码:**A**文章编号:**1672-9455(2018)16-2379-04

Analysis of the best conditions for the production and staining of Plasmodium thick blood film*

ZHANG Wenping¹, ZHANG Qiuping², LI Dongling¹, ZHANG Zhongming¹,
YANG Yanmei¹, LUO Yanting¹, SHAN Wanshui^{1△}

(1. Department of Clinical Laboratory, Shenzhen Third People's Hospital, Shenzhen,

Guangdong 518114, China; 2. Department of Obstetrics and Gynecology,

Maternal and Child Health Hospital of Luohu District, Shenzhen, Guangdong 518019, China)

Abstract: **Objective** To explore the optimal conditions for the production and staining of the thick film of Plasmodium. **Methods** Peripheral blood samples of 3.0 μL , 4.0 μL and 5.0 μL were made into thick blood films of 0.8 cm, 1.0 cm, and 1.2 cm, respectively. According to the standard scoring system of thick blood film production, the highest score was selected as the thick blood film production method. Under normal laboratory conditions, the dyeing concentration was prepared by diluting the Giemsa dye solution and the supporting buffer at a ratio of 1:19, 1:9, 3:7 and 2:8, the dyeing time was 10, 20, 30, 40 min, respectively. According to the standard scoring system for thick film staining, the best way was to dye with the highest score. **Results** The thick blood film with a diameter of 1.0 cm had a higher score with a concentration of 4.0 μL and 5.0 μL , the highest proportion of blood with a score of 4.6 μL was the highest, which was recommended as the best method to make thick blood film. The optimal dye concentration and optimal staining time of Plasmodium thick blood membrane were 3:7 dilution, staining for 10 min and 1:9 dilution, staining for 30 min, got the most ratio of score "A", achieved excellent dyeing results. **Conclusion** The best blood volume for the diagnosis of Plasmodium thick blood membrane is 4.6 μL , and the corresponding optimal diameter is 1.0 cm. The best staining effect can be achieved by dilution at 3:7, dilution for 10 min and 1:9 dilution, and staining for 30 min. It is convenient to identify Plasmodium worms, improve the detection rate, and can be applied under normal experimental conditions.

Key words: Plasmodium; thick blood film; Giemsa staining

依据世界卫生组织(WHO)2008 年的标准,实验室诊断是疟疾患者确诊和及时得到治疗的基础。目前实验室开展的方法主要包括血涂片镜检方法、快速免疫层析试纸条法和分子诊断法^[1];而镜检疟原虫迄

今仍是确诊疟疾最迅速、最直观、最经济且实用器材简便,结果最可靠的方法。疟原虫镜检是疟疾诊断的“金标准”,需要经验丰富的技术人员,尽管目前可以通过形态学分析图像自动检测识别疟原虫,但是制片

* 基金项目:广东省深圳市知识创新计划资助项目(JCYJ20150402111430615);广东省深圳市三名工程项目(SZSM201412005)。

作者简介:张文萍,女,副主任技师,主要从事临床检验血液形态学方面的研究。△ 通信作者, E-mail: shanwanshui152@aliyun.com。

和染色仍然是关键^[2-3]。本课题组成员通过近几年的不断摸索改进,制作出检测疟原虫的厚涂片,同时制订出一套评分标准,系统判断结果的优劣,使判断标准数字化,现将结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2015 年 1 月至 2017 年 12 月深圳市第三人民医院首次检出的 46 例疟原虫阳性患者为研究对象,收集其乙二胺四乙酸二钾(EDTA-K₂)抗凝外周血标本,每份标本约 5 mL,用于厚血膜的制作。

1.2 仪器与试剂 姬姆萨染液由(台资)珠海贝索生物技术有限公司生产,高品质显微镜载玻片世泰牌规格为 26 mm×76 mm,厚度 1.0~1.2 mm;数字显示鼓风干燥箱(GZX-9140 MBE);莱卡显微镜(德国 DM 3000 LED)。

1.3 制片和染色方法^[4-5]

1.3.1 厚血膜制作方法及分组情况 在白色硬纸上制作好玻片模具(直径为 0.8、1.0、1.2 cm 的圆圈,1 张玻片上可同时划 2 个大小相同的圆圈),将玻片置于 10% 的稀盐酸浸泡 24 h 后、蒸馏水冲洗干净后沥干,装玻片盒里待用;试验时将处理过的玻片置于模具上,准确吸取血标本 3.0、4.0、5.0 μL 和 4.6 μL,分别置于 0.8、1.0、1.2 cm 的圆心上,用玻片一侧的钝角自内向外涂成相应直径的圆形均匀的血膜,每张玻片上可做 2 个厚血膜,每份标本根据应用血量和其相应直径的各项条件制作 6 个厚血膜,相当于试验重复 6 次,保证了可重复性和稳定性检测达到相关标准^[6-7]。且每项相同试验条件作出 3 张片子上有 6 个厚血膜以 1 人份计,取其 6 个厚血膜评分的平均值纳入统计数据中。分组情况:用血量分别为 3.0、4.0、5.0 μL、直径 0.8 cm 厚血膜为直径 0.8 cm 组;用血量分别为 3.0、4.0、5.0 μL、直径 1.0 cm 的厚血膜为直径 1.0 cm 组;用血量分别为 3.0、4.0、5.0 μL、直径 1.2 cm 的厚血膜为直径 1.2 cm 组。

1.3.2 染色方法 制作一个避光器皿装配好的应用染液,按照实验的要求将染液和缓冲液配成相应的比例混匀置于避光器皿中现稀释现用,将干透的厚血膜置于染色架上,将应用染液滴于按照 1.3.1 方法制好的血膜,本实验将染液和缓冲液按照 1:19、1:9、

3:7、2:8 比例稀释,每组染色时间为 10、20、30、40 min 后,用镊子稳抓玻片,垂直轻轻浸于准备好的蒸馏水,让厚血膜浸没水中后轻而迅速提上来,重复 2~3 次,沥干后待镜检。制作好自然干透的厚血膜在显微镜下先后进行 10×100 倍选视野,100×100 倍观察形态,疟原虫的核呈紫红色、胞浆呈现浅蓝色,形状呈现点状、逗号以及弧形、偶有配子体为阳性标本。可重复性和稳定性检测参照文献[6-7]。

1.4 结果判读 将制作好的各直径的厚血膜自然干燥 3 h,结果以总体评分最高者为优(评分标准参照表 1)。不同用血量和不同直径对厚血膜制片效果影响的评分标准,通过观察厚血膜的干燥程度、冲片时血膜是否有脱落及脱落的程度、兼顾经染色后的血膜对光观察它的透光度等进行评分;厚血膜的染色效果通过镜检观察确定评分标准(评分标准参照表 2)。参照前期厚血膜得分最高为制作方法做出的血膜干透后染色,首先进行预实验,姬姆萨染液和配套缓冲液分别按 1:19、1:14、1:9、3:7、2:8 的比例稀释,染色时间分别为 10、15、20、25、30、35、40 min。通过预试验确定染色浓度为姬姆萨染液和配套缓冲液分别按 1:19、1:9、3:7、2:8 的比例稀释,染色时间分别为 10、20、30、40 min 作为最终试验,厚血膜染色效果评分分为 4 个等级,A 级:>7~9 分;B 级:>5~7 分;C 级:3~5 分;D 级:3 分以下。评分标准根据广东省疾病预防控制中心多位专家多次研讨会议拟定,且参照许文荣等^[8]判断标准,每份标本的判断均由 3 位对厚血膜制作具有丰富经验的专业技术人员共同商定共识的结果。

2 结果

2.1 不同用血量和不同直径对厚血膜制片效果影响 直径 0.8 cm 组和直径 1.2 cm 组中得分均集中在 3~5 分;直径 1.0 cm 组得分集中在 4~6 分,其中用血量 4.0 μL 和用血量 5.0 μL 的血膜得分在 5~6 分所占比例最大,直径 1.0 cm 组中血量 5 μL 中得分最高者 6 分的占 45.7%,结合试验呈现此结果,笔者将用血量细化到用血量 4.6 μL,发现得分在 5~6 分所占比例相对于用血量 4.0 μL 和 5.0 μL 的比例有增加,见表 3。

表 1 厚血膜制片评分标准

评分(分)	干燥情况	冲片情况	染色后透光度(对光看)
0	血膜明显裂痕	血膜脱落大于 1/2	血膜完全不透光或透光度略小于 1/2
1	血膜细微裂痕	血膜脱落小于 1/2	血膜透光度大于 1/2 且血膜透光度小于 1
2	血膜无裂痕,较完整	血膜均无脱落	血膜完全透光

表 2 厚血膜的染色效果评分标准

评分(分)	红细胞的溶解情况	血膜背景	白细胞着色情况
0	溶解的红细胞小于或等于 1/4	杂乱、沉渣沉淀物较多,或疟原虫及其结构难以辨认	核染色质结构模糊,不可辨认,黏成深紫黑色一团
1	溶解的红细胞大于 1/4 且小于或等于 1/2	模糊,沉渣沉淀物易见,或疟原虫及其结构勉强可辨	核染色质结构模糊,紫黑色,胞质颗粒勉强可见
2	溶解的红细胞大于 1/2 且小于 3/4	较干净,沉渣沉淀物少,或疟原虫及其结构清晰可辨	核染色质结构清晰,紫色,胞质颗粒可见
3	溶解的红细胞大于 3/4 且小于或等于 1	干净,沉渣沉淀物未见,且疟原虫及其结构清晰可辨	核染色质结构清晰,紫色核质分明,颗粒易辨

表 3 直径 0.8、1.0、1.2 cm 组中厚血膜制片效果评分情况[n(%)]

总体 得分	3.0 μL			4.0 μL			5.0 μL			4.6 μL		
	直径 0.8 cm	直径 1.0 cm	直径 1.2cm	直径 0.8 cm	直径 1.0 cm	直径 1.2cm	直径 0.8 cm	直径 1.0 cm	直径 1.2cm	直径 0.8 cm	直径 1.0 cm	直径 1.2cm
2	10(21.7)	0(0.0)	1(2.2)	3(6.5)	0(0.0)	2(4.3)	4(8.7)	0(0.0)	2(4.3)	—	0(0.0)	—
3	9(19.6)	4(8.7)	9(19.6)	14(30.4)	3(6.5)	9(19.6)	18(39.1)	3(6.5)	10(21.7)	—	2(4.3)	—
4	12(26.1)	14(30.4)	12(26.1)	16(34.8)	11(23.9)	14(30.4)	16(34.8)	7(15.2)	16(34.8)	—	7(15.2)	—
5	10(21.7)	18(39.1)	10(21.7)	12(26.1)	17(37.0)	16(.4.8)	7(15.2)	15(32.6)	13(28.3)	—	17(37.0)	—
6	5(10.9)	10(21.7)	4(8.7)	1(2.2)	15(32.6)	5(10.9)	1(2.2)	21(45.7)	5(10.9)	—	20(43.5)	—

注：—表示该项无数据

表 4 不同染液比例和不同染色时间对厚血膜染色效果的评分结果[n(%), n=46]

稀释比例	10 min		20 min		30 min		40 min	
	评分等级	构成比	评分等级	构成比	评分等级	构成比	评分等级	构成比
1∶19	D	18(39.1)	D	20(43.5)	C	21(45.7)	C	17(37.0)
1∶9	B	17(37.0)	B	21(45.7)	A	27(58.7)	B	19(41.3)
3∶7	A	24(52.2)	B	18(39.1)	B	17(37.0)	C	19(41.3)
2∶8	B	22(47.8)	B	23(50.0)	B	20(43.5)	C	23(50.0)

2.2 不同染液比例和染色时间对染色效果影响的评分 3∶7 染色 10 min 和 1∶9 染色 30 min 评分中出现 A 级比例最多,分别占 52.2%和 58.7%,达到良好,令人满意的效果。见表 4。

3 讨 论

显微镜镜检疟原虫诊断是临床确诊的依据,且显微镜镜检疟原虫血涂片分为厚血膜和薄血膜,厚血膜能使疟原虫浓集,易被发现,据不完全统计阳性率是薄血膜的 20 倍[9-10]。

薄血膜制作操作简单,且固定后染色受影响因素小,主要用于观察红细胞内疟原虫的结构,判断出疟疾的分型及发育阶段,但发现疟原虫感染是诊断的前提,因此成功制作厚血膜是诊断疟疾的关键。本研究旨在在常规实验室条件下,通过科学的血涂片判断的标准积分系统评价制片的优劣等级,通过大量的试验去比较,寻找出厚血膜最佳的制片和染色方法以便推广应用。

本实验室工作人员在 2014 年以前采用文献[6-7]的制作方法,先使用蒸馏水溶解厚血膜中红细胞,再进行染色,实际操作中却发现这种方法血膜容易脱落、使得第 2 步骤应用染液被稀释不可控因素较多,两个步骤很难标准化;再者,笔者在实验室曾经多次使用文献[6]离心的方法,但使用抗凝血标本混匀后直接加全血制成的血膜自然干透时间更短,缩短了报告时间,且不离心制成的血膜相对于离心后取细胞层制成的血膜稳固且红细胞易溶解,这可能与未离心的血含有一定的血浆等有效成分黏附性较强容易贴于玻片,且红细胞密度相对较少易于溶解完全。由此可见,经过长期的不断探索和持续改进,本实验室现采用本研究制片方法操作简单、成功率高,便于镜检观察,迄今未有漏检。

试验经验总结疟原虫厚血膜涂片制作质量与其

直径和用量关系密切。实践中发现,血膜太小或太大均容易脱落,长期试验结果显示,直径为 0.8~1.2 cm 的厚血膜不易脱落,这可能跟血膜干透过程中的表面张力有关。本研究结果表明,直径 0.8 cm 组中厚血膜直径越小,用量最大(如 0.8 cm、5.0 μL),所制作出的厚血膜冲片时越易掉落,且透光度越低。而直径 1.2 cm 组直径越大,用量越少的厚血膜(如 1.2 cm、3.0 μL)透光度越好,但是血膜干燥后受张力等因素的影响,一方面会使其干燥后易出现裂痕,另一方面用量少所能观察到的疟原虫在数量上会相应地减少;直径 1.2 cm 组的厚血膜随着用血量的增大其干燥情况越好,冲片情况也愈好,但其透光度就相对减低。直径 1.0 cm 组中各用血量的厚血膜稳定性均能取得较好的效果,但是是 3.0 μL、1.0 cm 的厚血膜血量较少,干燥情况欠佳,且镜下所能看到的疟原虫数量会相应地减少,试验中用量 4.6 μL 做成的直径 1.0 cm 效果最好,虫体能均匀散开且密度也可观。而 5.0 μL、1.0 cm 的用量冲片时较 1.0 cm、4.0 μL 和 4.6 μL 的厚血膜易掉,透光度也相应地降低。试验中长期不断摸索发现,制好的血膜透光性越好,表明血膜溶血越完全。

最佳的染色状态是疟原虫和白细胞的细胞质被染成蓝色,疟原虫的核和白细胞核被染成紫红色[11],比较对不同染色时间和不同染液浓度制成的厚血膜试验中发现,大部分染色效果都能达到 B 级和 C 级,只有合适的染色时间和配制合适的染液比例能达到 A 级。从本研究结果可见,染液浓度高,其着色就快而深,但颜色常偏碱,偏碱时白细胞的嗜伊红颗粒等被染成紫蓝色,不易察觉。浓度偏低且染色时间长效果才好,染色时间短反映出的效果颜色偏酸[12]。

1∶9 染色 30 min 和 3∶7 染色 10 min 均能达到理想的染色效果,即总体评分能达到 5~6 分。而

3:7 染色 10 min 在时间上更有优势,最佳染色条件受其所在实验室条件所制约,因为染色效果会受染液、缓冲液质量和染色用水等因素的影响,而该研究中只需冲片时才用到水,为本实验室制备的普通去离子水即可,此方法与唐琼华等^[13]的改良方法相似,均将溶血与染色合为一步完成相同,不同之处为本研究方法采用的染液是姬姆萨染液,易于购买,适合于类似本实验室中的常规条件的其他血液寄生虫的检查,易于标准化,重复性与稳定性的高,可操作性强。

综上所述,不同直径和用量对厚血膜的制作效果有一定的影响,研究结果显示,用量为 4.6 μ L、直径为 1.0 cm 制作的血膜效果为最佳;染液和缓冲液按 1:9 稀释染色 30 min、染液和稀释液按 3:7 稀释染色 10 min 均能达到理想的染色效果,试验中染液和缓冲液配制后避光 2 h 内用完。

参考文献

[1] 卢愈新,覃丕恩,潘茂华.等.疟疾快速诊断试剂卡与镜检及乳酸脱氢酶检验结果比较观察[J].中国医药科学,2017,7(16):7-9.

[2] 张娟胜,张弟强,王晔,等.疟原虫薄血膜图像自动检测技术研究进展[J].中国血吸虫病防治杂志,2017,29(3):388-392.

[3] 吴忠道.临床寄生虫学检验[M].北京:中国医药科技出

版社,2004:158.

[4] 沈继龙,张进顺.临床寄生虫学检验[M].4 版.北京:人民卫生出版社,2015:129.

[5] 郑挺,李进,周思.两种染色方法疟原虫镜检效果比较[J].安徽预防医学杂志,2012,18(6):479-480.

[6] 陆炜高,韦登球,张宇.疟原虫厚血膜改良染色法的诊断效果[J].检验医学与临床,2017,14(1):128-129.

[7] 徐华么.改良厚血膜疟原虫染色法[J].中国寄生虫学与寄生虫病杂志,1999,17(4):31.

[8] 许文荣,王建中.临床血液学检验[M].5 版.北京:人民卫生出版社,2012:39-45.

[9] 安兴贵,马元芹,张林林.泰安市岱岳区 2008—2016 年输入性疟疾流行病学分析[J].中国寄生虫学与寄生虫病杂志,2017,35(4):415-416.

[10] 刘成玉,罗春丽.临床检验基础[M].5 版.北京:人民卫生出版社,2014:15-16.

[11] 赖专华,杨海峰,武永平,等.吉氏染色法对疟原虫染色效果影响因素分析[J].海峡预防医学杂志,2014,20(6):49-50.

[12] 严彩娟.桂林市 2008—2013 年输入性疟疾流行病学分析[J].中国热带医学,2014,14(7):871-872.

[13] 唐琼华,何伟业.疟原虫厚血膜染色方法的改良[J].医学信息,2014,15(34):251.

(收稿日期:2017-12-20 修回日期:2018-02-14)

(上接第 2378 页)

参考文献

[1] 曾国华,麦赞林,夏术阶,等.中国成年人群尿石症患病率横断面调查[J].中华泌尿外科杂志,2015,36(7):528-532.

[2] 王辉,张力,郝宗耀,等.尿石病相关风险因素的研究现状[J].现代泌尿外科杂志,2016,21(10):814-816.

[3] BAUMANN J M, AFFOLTER B. From crystalluria to kidney stones, some physicochemical aspects of Calcium nephrolithiasis[J]. World J Nephrol, 2014, 3(4): 256-267.

[4] 吴敬彰,赵津津,张占五,等. TRPV5 和 OPN 在泌尿系结石患者肾组织中的表达及意义[J].广东医学,2016,37(20):3101-3104.

[5] 那彦群,叶章群,孙颖浩,等.中国泌尿外科疾病诊断治疗指南[M].北京:人民卫生出版社,2014:130-135.

[6] LEIHERER A, MUENDLEIN A, SAELY C H, et al. The value of uromodulin as a new serum marker to predict decline in renal function[J]. J Hypertens, 2018, 36(1): 110-118.

[7] LIU Y, MO L, GOLDFARB D S, et al. Progressive renal papillary calcification and ureteral stone formation in mice deficient for Tamm-Horsfall protein[J]. Am J Physiol Re-

nal Physiol, 2010, 299(3): F469-F478.

[8] VISWANATHAN P, RIMER J D, KOLBACH A M, et al. Calcium oxalate monohydrate aggregation induced by aggregation of desialylated Tamm-Horsfall protein[J]. Urol Res, 2011, 39(4): 269-282.

[9] KHAN S R, JOSHI S, WANG W, et al. Regulation of macromolecular modulators of urinary stone formation by reactive oxygen species; transcriptional study in an animal model of hyperoxaluria[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2014, 306(11): F1285-F1295.

[10] 张杰,湛卫,袁继行,等.草酸钠结晶肾损伤肾小管上皮细胞中骨桥蛋白相关长链非编码 RNA 的差异表达[J].第二军医大学学报,2017,38(5):616-620.

[11] LI X, LIU K, PAN Y, et al. Roles of osteopontin gene polymorphism (rs1126616), osteopontin levels in urine and serum, and the risk of urolithiasis: a meta-analysis [J]. Biomed Res Int, 2015, 2015: 315043.

[12] LANGDON A, WIGNALL G R, ROGERS K, et al. Kinetics of Calcium oxalate crystal growth in the presence of osteopontin isoforms: an analysis by scanning confocal interference microcopy[J]. Calcif Tissue Int, 2009, 84(3): 240-248.

(收稿日期:2017-11-30 修回日期:2018-02-24)