

简便快速实用的杜氏利什曼原虫前鞭毛体培养方法

马顺高, 钟国梁, 杨国顺, 桑卫洪, 秦红群, 杨秀亮(云南省大理州人民医院检验科 671000)

【摘要】 目的 介绍一种简便快速实用的杜氏利什曼原虫前鞭毛体乙二胺四乙酸二钾(EDTA-K₂)离心管培养方法。**方法** 对 1 例经形态学和血清学检查确诊的黑热病患者,采集其骨髓液用 EDTA-K₂ 离心管培养。**结果** 经本法快速检出杜氏利什曼原虫的前鞭毛体,并经过再次重复试验也获得相同的结果。**结论** EDTA-K₂ 离心管培养法是一种简便快速实用的杜氏利什曼原虫前鞭毛体培养方法。

【关键词】 杜氏利什曼原虫; 鞭毛体; 培养方法; 乙二胺四乙酸二钾; 离心管

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2010.22.038

中图分类号:R446.5

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2010)22-2504-02

黑热病诊断的主要依据是检出杜氏利什曼原虫的利杜体和/或前鞭毛体,用骨髓液涂片检查阳性率不高或因病原体的形态不典型而不易辨认;体外培养法(三 N 法或其改良法)虽然可以提高检出率和诊断准确性,但方法繁琐、培养周期长,琼脂碎片影响制片效果及对虫体形态的观察,实用性不满意。本文对 1 例经形态学和血清学检查确诊的黑热病患者,采集其骨髓液用 EDTA-K₂ 离心管培养法快速检出杜氏利什曼原虫的前鞭毛体,并经过再次重复试验也获得相同的结果。现报道如下。

1 资料与方法

1.1 病例选择 选择本院 2008 年 7 月经临床和骨髓细胞学诊断为黑热病的 1 例病例,该病例经中国疾病预防控制中心寄生虫病防治所丝虫病、黑热病、包虫病室最终确诊。

1.2 材料 1.0 mL EDTA-K₂ 离心管(俗称子弹头),由姜堰市天力医疗器械有限公司提供。双相血培养瓶,由生物梅里埃公司提供。

1.3 方法 抽取骨髓液 0.5~1.0 mL 放入 EDTA-K₂ 离心管内(1 mL 骨髓液含 EDTA-K₂ 的浓度为 2~4 mg)混匀,置 22~25℃温箱或室温培养 24 h 后,取出按常规骨髓细胞学涂片、染色,隔日观察 1 次。同时作骨髓细菌学培养;外周血涂片检查;抽取静脉血 5 mL 分离血清后送云南省寄生虫病防治所作黑热病 rk39 血清学试验。

2 结果

2.1 骨髓涂片巨噬细胞内可见数量较多的利杜体(图 1) 经 EDTA-K₂ 离心管培养 24 h 后涂片镜检可见早期前鞭毛体,从基体发出鞭毛粗短,长约 2~5 μm(图 2);经 48 h 培养后涂片镜检,可见粗短型或长梭型前鞭毛体,鞭毛长约 5~15 μm(图 3);经 72 h 培养后涂片镜检可见大量成熟前鞭毛体,前鞭毛体鞭毛清晰可见、形态典型,虫体多呈长梭型,大小约(15~20) μm×(1.5~2) μm,动基体及从基体发出鞭毛清晰可见,鞭毛长约 15~20 μm(图 4),此特点与其在雌白蛉胃内发育过程基本相一致,体外培养获得成功。该培养法虫体密度高,涂片背景清晰,无其他病原体生长,形态典型、易于鉴别,有利于鉴别诊断。

2.2 EDTA-K₂ 离心管培养法涂片所见前鞭毛体易与荚膜组织胞浆菌孢子和马尔尼菲青霉菌孢子相鉴别。

2.3 该病例采用 EDTA-K₂ 离心管培养法前后两次培养结果一致,与三 N 培养法及改良培养法相比,EDTA-K₂ 离心管培

养法简便、快速,培养时间明显缩短(72 h)。

注:呈圆形或卵圆形,经瑞氏染色后细胞质呈淡蓝色或淡红色,细胞核圆形呈红色或紫红色,核旁可见一细小杆状深染的动基体,与核呈“T”字型。

图 1 巨噬细胞内可见多个利杜体

注:早期前鞭毛体多为粗短形,隐显可见粗短鞭毛,动基体深染,呈紫红色。

图 2 骨髓培养 24 h 后的早期前鞭毛体形态

注:前鞭毛体的鞭毛清晰可见,由短变长,发育为粗短型或梭型前鞭毛体,动基体深染,呈紫红色。

图 3 骨髓培养 48 h 后的前鞭毛体形态

注:前鞭毛体的鞭毛细长、清晰可见,发育为大量成熟前鞭毛体,呈长梭型,并以纵二分法繁殖,动基体深染,呈紫红色。

图 4 骨髓培养 72 h 后的前鞭毛体形态

2.4 黑热病 rk39 免疫诊断试纸条血清学试验阳性;外周血涂片染色镜检未见利杜体;骨髓细菌学培养 10 d 无荚膜组织胞浆菌和马尔尼菲青霉菌生长,无细菌生长,骨髓培养液涂片未见杜氏利什曼原虫前鞭毛体。

3 讨论

黑热病是由杜氏利什曼原虫引起的,通过白蛉传播的慢性地方性传染病。常引起全身症状,其临床主要特点是长期不规则发热、贫血、消瘦、鼻出血、肝脾进行性肿大及全血细胞减少。是危害严重的人畜共患寄生虫病。在我国主要分布于甘肃、青

海、宁夏、四川、陕西、内蒙古、新疆和山西等地的丘陵山地。近几年来黑热病非典型病例增多^[1],加之人口流动频繁,许多省份首报病例多为输入性病例^[2],该病有向非流行区扩散趋势。

黑热病与荚膜组织胞浆菌病、马尔尼菲青霉菌病的临床表现及病原体形态极易混淆。临床上 3 者均可表现为长期不规则高热、消瘦、肝脾进行性肿大,全血细胞减少,临床不易鉴别。对 3 种疾病的病原体加以鉴别是避免误诊的关键。未经体外培养查找不到利什曼原虫前鞭毛体,又由于制片、染色及缺乏形态学实践经验等诸多因素,3 者不易鉴别,在非流行区常有误诊报道^[3]。诊断该病的关键是准确无误地查到病原体。本文 EDTA-K₂ 离心管培养法培养的前鞭毛体,细长的鞭毛清晰可见,动基体明显、着色较深,绝大多数检验人员特别是缺乏形态学实践经验者易于辨认。

利杜体胞核占胞体 1/3~1/2,核旁可见 1 个小而深染的动基体;荚膜组织胞浆菌胞核占胞体 1/3~1/2,部分孢子的胞壁较厚,使其周围形成不着色的薄的空晕,形似荚膜;马尔尼菲青霉菌大小不一,类圆形、长圆形或腊肠状,中间可见一浅染的横隔^[4]。利杜体形态典型、数量多,经形态学经验丰富的检验人员细致辨认,3 者亦可鉴别。但数量少、形态不典型者,利杜体与后两者不易鉴别。三 N 培养基由于温度的作用和在试管内较长时间的液体浸泡,使培养基变得脆而软,制片时出现许多琼脂碎片,涂片前因反复洗涤、离心的作用均影响制片效果^[5],加之培养时间较长(一般大于 10 d)、培养基制备繁琐,应用效果欠佳,改良法虽然对三 N 培养基进行了改进,但与本文介绍的 EDTA-K₂ 离心管培养法相比仍达不到简便、快速和实用的效果。本研究建立的 EDTA-K₂ 离心管培养法前鞭毛体形态典型,易于辨认,该培养法简便、快速(72 h)、技术要领易掌握,成本低廉,易于推广,实用性强,具有较高的应用价值。

简便快速培养出前鞭毛体对快速诊治黑热病及鉴别诊断具有重要意义。

本文介绍的 EDTA-K₂ 离心管培养法,分别经 24、48、72 h 培养后,涂片染色镜检发现前鞭毛体的发育过程与其在雌白蛉胃内发育过程相一致^[6], EDTA-K₂ 离心管培养法杜氏利什曼原虫前鞭毛体能快速生长发育可能与骨髓液在体外作为天然培养基和/或 EDTA-K₂ 的作用有关,是 EDTA 的螯合作用或是 K 离子的作用,还是抗凝剂促进了虫体的生化代谢反应,其机制值得探讨。

参考文献

[1] 卢兴国,现代血液形态学理论与实践[M],上海:上海科学技术出版社,2003:313-314.
[2] 蒋翎翎,邓碧兰,逯军,等.海南省首例输入性内脏利什曼病例报告[J].中国寄生虫学与寄生虫病杂志,2008,26(3):封二.
[3] 祁子斌,董昌麟.黑热病误诊一例[J].中华传染病杂志,2008,26(6):366.
[4] 丛玉隆,李顺义.疑难病细胞学诊断[M],北京:人民卫生出版社,2008:85-87.
[5] 王克信,宋葆华,尹美珍,等.杜氏利什曼原虫前鞭毛体的培养和染色方法的改进[J].寄生虫与医学虫学报,2000,7(2):127-128.
[6] 沈继龙主编,临床寄生虫学和寄生虫检验[M],北京:人民卫生出版社,2004,126-129.

(收稿日期:2010-06-05)

临床研究

LTS-3000 全自动液基薄层细胞制片染片系统在
宫颈病变筛查中应用

李荣敏,韦现阁,莫福志,韦平宣(广西河池市第一人民医院检验科,宜州 546300)

【摘要】 目的 评价全自动液基薄层细胞(TCT)制片染片系统在宫颈病变筛查中的临床应用价值。**方法** 采用 LTS-3000 液基薄层细胞制片染片系统对本院收集到 2 523 例进行宫颈病变筛查,细胞学诊断未明确意义的不典型鳞状上皮病变细胞(ASCUS)和非典型腺细胞(AGC)及以上者行阴道镜下宫颈活检,并进行病理组织学诊断。**结果** 共检出阳性涂片 181 例,占 7.17%,其中 ASCUS 有 93 例,占 3.68%,低度磷状上皮内病变(LSIL)有 75 例,占 2.97%,高度磷状上皮内病变(HSIL)有 8 例,占 0.32%,鳞状细胞癌(SCC)有 4 例,占 0.16%,AGC 有 1 例,占 0.04%。**结论** 全自动液基薄层细胞制片染片技术应用于宫颈病变筛查有较高阳性检出率,诊断迅速,准确率高。

【关键词】 全自动液基细胞; 宫颈病变; 筛查

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2010.22.039

中图分类号:R711.74

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2010)22-2505-03

宫颈癌是最常见的恶性肿瘤之一,发病率仅次于乳腺癌,位于女性肿瘤的第 2 位,全世界每年大约有 20 万妇女死于这种疾病。在发展中国家宫颈癌则属常见多发的妇科肿瘤。我国每年新发现的病例为 13.15 万,占女性生殖系统恶性肿瘤发病率的 73%~93%,而在发达国家,其发生率明显下降,很大程度上归因于宫颈癌前病变的早期诊断和治疗。因此,要降低宫颈癌的发病率,宫颈癌前病变检查是关键,选择细胞涂片阳

性检出率高、准确性好的技术至关重要,现有最新研发应用于临床的全自动液基薄层细胞制片染片系统,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2009 年 8 月至 2010 年 2 月,就诊于本院妇科门诊及到本院体检科进行防癌普查的单位体检妇女 2 523 例,年龄 20~72 岁,平均 43.5 岁。对其中 181 例宫颈上皮轻度非典型增生(ASC)以上者进行阴道镜下活检,并将全自动液基薄