

抗凝剂和缓冲液对血涂片染色的影响

李琛 李璐

作者单位: 524001 广东湛江, 广东医科大学附属医院检验科(李琛)

524023 广东湛江, 广东医科大学组胚教研室(李璐)

通讯作者: 李璐, Email: 407776583@qq.com

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7151.2018.02.003

【摘要】 目的 探讨抗凝剂和乙酸盐缓冲液提高血涂片染色质量中的使用方法。**方法** 血涂片操作中对传统方法进行改良, 精确使用抗凝剂, 并用乙酸盐缓冲液(HAc-NaAc)代替磷酸盐缓冲液($\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$), 在乙酸盐缓冲液中加入 5%~10% 瑞氏-吉姆萨复合染液制备血涂片, 光学显微镜下观察血涂片的血细胞染色形态。**结果** 与传统方法比较, 改良后的方法可缩短染色时间(由传统方法的 8~13 min 缩短为 2 min 左右); 光学显微镜下观察血细胞染色形态时显示, 各种血细胞结构清晰, 着色稳定。**结论** 该方法可提高血涂片染色的质量和人工复检的效率。

【关键词】 血涂片; 乙酸盐缓冲液; 磷酸盐缓冲液; 抗凝剂

The effect of anticoagulant and buffer solution on blood smear

Li Chen, Li Lu. Department of Clinical Laboratory, the Affiliated Hospital of Guangdong Medical University, Zhanjiang 524001, Guangdong, China (Li C); Department of Histology and Embryo, Guangdong Medical University, Zhanjiang 524023, Guangdong, China (Li L)

Corresponding author: Li Lu, Email: 407776583@qq.com

【Abstract】 Objective To explore the usage method of anticoagulant and acetate buffer in order to improve the staining quality of blood smear. **Methods** The traditional method was improved in blood smear operation, including the exact use of anticoagulants, replacing phosphate buffer solution ($\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$) with acetic acid buffer solution (HAc-NaAc), blood smear being prepared by adding 5% to 10% Wright Giemsa complex dye solution in acetate buffer, and then the staining pattern of blood cell forms in the smear was observed under an optical microscope. **Results** Compared with the traditional method, the improved method can shorten the dyeing time (8-13 min of the traditional method is shortened to 2 min). The morphology of blood cells was observed under an optical microscope, showing that the structure of various blood cells was clear and coloring was stable. **Conclusion** This improved method can elevate the quality of blood smear dyeing and enhance the efficiency of manual reexamination.

【Key words】 Blood smear; Acetate buffered saline; Phosphate buffered saline; Anticoagulant

血液是流动于心血管内的液态组织, 又称外周血。血涂片在临床检验和教学工作中应用广泛, 特别是对各种血液病的诊断和治疗有很大价值。血细胞具有重要的生理功能, 其形态结构和功能对指导疾病诊断具有重要意义, 也是血细胞检测教学的重点^[1]。为观察到染色效果好、结构清晰、层次分明、不易褪色的血涂片, 笔者经过长期实验探索发现, 在乙酸盐缓冲液(HAc-NaAc)中加入 5%~10% 瑞氏-吉姆萨复合染液制作的血涂片效果较满意, 现报告如下。

1 材料与方

1.1 试剂和仪器 医用干燥真空采血管、75% 医用乙醇棉球(山东安捷高科消毒科技有限公司), 抗凝

剂、瑞氏-吉姆萨复合染液(珠海贝索生物技术有限公司), pH ≈ 6.0 乙酸盐缓冲液(天津光复精细化工研究所), 无水乙醇(天津富宇精细化工有限公司), 载玻片(江苏世泰实验器材有限公司), 特种铅笔(中华牌), 电热恒温鼓风干燥箱(DHG-9070A 型上海精宏实验设备有限公司), 显微镜(OLYMPUS CX22)。
1.2 载玻片的清洗 新的载玻片上常含有游离碱, 表面附着菌丝, 使用前常应用清洗液或 10% 盐酸浸泡 24 h, 然后用纯净水清洗干净。由于手指表面上的油脂会污染玻片表面, 使用时应手持玻片边缘, 切勿触及玻片表面, 以保持玻片清洁、干燥、无油脂。血滴接触的边缘要平整光滑。

1.3 制备抗凝剂 ① 准确称取肝素钠 1 g, 加入到

100 mL 纯化水中充分溶解,得到抗凝剂母液。②用纯化水稀释抗凝剂母液至 0.5% 的浓度。③用 1 mL 注射器吸取 0.5% 的抗凝剂母液 0.2 mL,加入纯化水至 1 mL,得到备烘抗凝剂稀释液。④将上述 1 mL 稀释后的抗凝剂平均滴加到 10 个经过无菌处理的 5 mL 注射器中,轻轻转动注射器使肝素钠均匀分布在管壁上,以便后续取血时起到更好的抗凝作用,避免因注射器内的肝素钠分布不均使局部凝固和红细胞严重变形。⑤将装有备用抗凝剂稀释液的 5 mL 注射器置于 50 °C 电热恒温鼓风干燥箱中烘干^[2]。

1.4 血涂片的制备

1.4.1 采血 用医用干燥真空采血管采集人外周静脉血标本 2 mL,与烘干备用的抗凝剂 5 mL 充分混合,倒入青霉素小瓶中,贴好标签并分组,放入冰箱备用(最长可保存 5 h,尽量在放进青霉素小瓶后立即采用普通手工推片法进行推片操作)。

1.4.2 推片 取黄豆大小的血标本滴于准备好的载玻片一端,用另一边缘光滑的载玻片作为推片,置于血滴边缘,使血滴沿推片散开。通常推片与载血片呈 30°~45° 平稳向前推动,血液即在载玻片上形成薄膜。推片时,血滴越大、角度越大、推片速度越快,则血膜越厚,反之血膜越薄。推好片后手持玻片轻轻挥动,迅速干燥血膜,因血液会向下流动,因此干燥好的玻片应直立放置于立式染色缸中,以避免血细胞皱缩和血膜中央的血细胞数量减少。

1.4.3 固定 血膜干燥呈白色,干燥后用无水乙醇固定 10 min,血膜固定后可长期保持血细胞的完整性,避免细胞溶解收缩和破碎。注意要点:①血膜若未干透,细胞未牢固附在载玻片上,在染色过程中容易脱落,因此血膜必须充分干燥。②血膜未干时进行染色,血细胞易漂浮于染液中,并在冲洗过程中随染液一起冲走,从而使血细胞减少、变性,甚至无血细胞。③天气寒冷时,置于 37 °C 电热恒温鼓风干燥箱中保温促干,避免细胞变形缩小。④固定液无水乙醇可用丙酮代替。

1.4.4 染色

1.4.4.1 传统方法 取固定好的血涂片,用特种铅笔在血膜两侧分别划 2 道直线,避免染液外溢。因体积大的细胞常在此出现,应保护尾部细胞。将血膜平放于染色架上,滴 2~3 滴瑞氏-吉姆萨复合染液在血膜上,染液覆盖血膜,染色 1 min。滴加 pH ≈ 6.8 磷酸盐缓冲液 ($\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$) 2 min,待与染液混合后再染 5~10 min,然后从血涂片中间加入蒸

馏水,使染液从玻片四周溢出,以减少杂质沉淀^[3]。

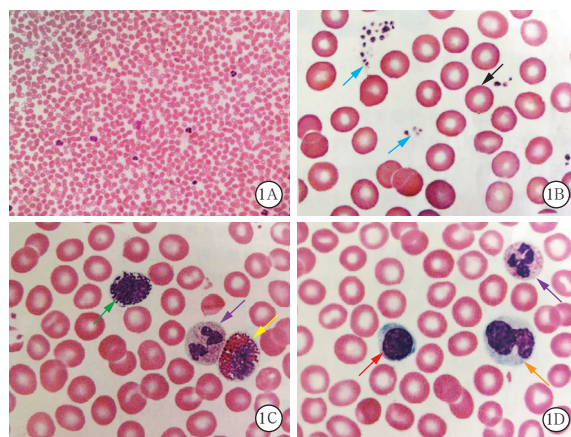
1.4.4.2 改良法 染色步骤同传统方法,染色后浸泡于 pH ≈ 6.0 的乙酸盐缓冲液中,并加入 5%~10% 的染液,1 min 后在 I、II 道蒸馏水中快速摇晃 2~3 次,洗去染液和分色。

1.4.5 封固 经染色的血涂片完全干燥后,镜检淘汰染色过深或过浅、有染色颗粒、血细胞分布不均的废片。用中性树胶直接滴一小滴到涂片上经染色的血膜区域,用小镊子夹取盖玻片一边,将盖玻片轻轻加压盖上,盖玻片与载玻片紧紧粘牢。放于室内通风处,待树胶干燥后可长期保存。

2 结果

传统方法的染色时间为 8~13 min,改良后方法的染色时间可缩短为 2 min。血涂片外观呈舌状,有明显的头、体、尾分布,四周完整留有空隙,厚薄适宜,分布均匀,无空泡,染色呈淡琥珀色。显微镜低倍观察显示,细胞均匀,分散无层叠。高倍观察显示,红细胞呈橘红色圆盘状,无细胞核;白细胞胞核呈紫红色,染色质清楚,粗细松紧可辨;血小板为不规则细胞质小块,周边均匀呈浅蓝色,中央为细小的紫红色颗粒;中性粒细胞胞核呈紫蓝色,颗粒呈浅红色,形态多样;嗜酸粒细胞胞核呈紫蓝色,颗粒呈橘红色;嗜碱粒细胞胞核呈紫蓝色;淋巴细胞胞核呈蓝灰色,胞质呈淡蓝色;单核细胞胞核呈蓝紫色,胞质呈灰蓝色。

经显微镜观察,改良法获得的血涂片染色具有与传统方法相同的效果,染色仍清晰,且改良法的着色更稳定,更便于识别和比较细胞的变化。见图 1。



注:黑色箭头所示为红细胞,蓝色箭头所示为血小板,紫色箭头所示为中性粒细胞,黄色箭头所示为嗜酸粒细胞,绿色箭头所示为嗜碱粒细胞,红色箭头所示为淋巴细胞,橙色箭头所示为单核细胞 低倍 ×10(图 1A) 高倍 ×100(图 1B, 1C, 1D)

图 1 血涂片染色镜检情况

3 讨论

血细胞形态学检验是临床基础检验技术,其临床应用价值不可忽视,但通常情况下,检验人员会单纯依赖血液分析仪,而忽视了形态学检验,因此常导致误诊和漏诊^[4]。血涂片镜检是指血液经推片、染色后,在光学显微镜下进行白细胞分类,红细胞、血小板形态观察以及寄生虫检查等,是血细胞形态学检查的基本方法^[5]。取血标本时需使用抗凝剂肝素钠,肝素钠抗凝剂的主要成分为肝素,其实质属于含硫酸基团的黏多糖,能够加强抗凝血酶Ⅲ灭活丝氨酸蛋白酶的作用,从而阻止凝血酶形成,起到抗凝血酶和阻止血小板聚集等多种作用。肝素钠抗凝剂的使用范围较广泛,研究证实,肝素中所含直链阴离子黏多糖的长短不同,具有较强的负电荷作用,呈强酸性,能够有效地避开血液凝固^[6]。制作血涂片时的用量很少,加入抗凝剂的量要求非常精准,用量过多会破坏细胞的形态,尤其是红细胞,造成严重的细胞变形(呈锯齿状);而用量偏少则达不到抗凝的效果。为简化临床采血操作,可在抗凝剂的剂量纠正公式基础上,改变为全血量=抗凝剂使用量/[$0.00185 \times (100 - \text{HCT})$],将抗凝剂使用量 0.2 mL 代入上述公式,则全血量=108.11/(100 - HCT)。这样可根据 HCT 进行采血,不用再调整抗凝剂用量,直接抽取调整后的全血量加入抗凝管即可,极大地提高了可操作性^[7]。

用无水乙醇固定干燥后的血膜,细胞溶胶状蛋白质脱水变性并凝聚成颗粒状、网状凝聚蛋白质,其次级键断裂溶解,结构脂质溶解,各种结构基团裸露,使复杂立体结构的凝聚蛋白质具有表面吸附能力,能够与染液中的色素分子发生物理化学性吸附而着色^[8]。

血涂片染色一般采用瑞氏染色法和吉姆萨染色法。瑞氏染色法时间短,对细胞质和中性颗粒染色效果较好,但保存时间短。瑞氏染料中的酸性曙红(伊红)和亚甲基蓝(美蓝)为水溶性,适合在乙酸盐溶液中进行着色。将弱酸性乙酸盐溶液用于酸性染料施染属于安全染法,用于碱性染料施染能防止碱性对色光的危害,降低染料上染速率,提高匀染性,作为助溶剂能使染料溶解良好且稳定,还有利于蛋白质肽链上 $-\text{NH}_3^+$ 和 $-\text{COO}^-$ 基团的电离。吉姆萨染色法易控制,对细胞核和疟原虫的染色效果较好,保存时间长,但染色时间长,价格高。改良瑞氏-吉姆萨复合染色法综合了上述两种方法的优点。染色

后加入 $\text{pH} \approx 6.0$ 的乙酸盐缓冲液洗染,与用磷酸盐缓冲液比较,减少了复染步骤,染色效果更好,作用更稳定,便于识别和比较细胞的变化,但由于缓冲液的 pH 值越高,会导致细胞质越不易着色,胞质、胞核对比较效果差。

制备血涂片应厚薄适宜,头尾分明,边缘整齐,两侧应留有空隙,细胞分布均匀。血膜太薄会使白细胞多集中在边缘,血膜太厚会使细胞重叠缩小。血细胞分析仪虽极大地提高了血细胞分析的效率,但目前国内使用的三分类均根据白细胞体积的大小进行分类,不能完全识别原始幼稚细胞、异型淋巴细胞、嗜酸粒细胞、嗜碱粒细胞以及中性粒细胞毒性变,甚至将一些小粒细胞当作中间细胞,大淋巴细胞当作粒细胞,大片成簇的血小板当作白细胞。因此,血涂片镜检对细胞结构异常的检查效果明显优于血细胞分析仪,在常规镜检中仍占有重要地位。

形态学检验技术是多学科理论性和实践性紧密结合的技术,形态学检验专业人员应具有较为全面的临床医学、检验医学和有关边缘学科的知识,具有扎实的检验技术基本功以及较高的素质。从事形态学检验的人员还应接受正规培训,相关科室建立形态学结果报告的评价认可制度,制定各种染色方法的质量控制标准,遵循阅片流程,充分发挥阅片者的主观能动性。同时阅片者还要有高度负责的态度,不放过细胞形态中的任何成分。只有如此才能不断提高检验人员的综合素质,为临床诊断和治疗提供科学依据^[9]。

参考文献

- 1 张立新,尚宏伟,路欣,等.血涂片制作与观察在医学形态学实验教学中的应用[J].中国医学装备,2013,10(9):37-38.
- 2 廖秋萍,井波,安济山,等.实验教学中血涂片抗凝剂的制备和使用方法[J].黑龙江畜牧兽医,2017,14(14):114-115.
- 3 李璐.血涂片染色方法的改良[J].华夏医学,2011,24(3):351-352.
- 4 石红梅.浅谈血细胞形态在疾病诊断中的重要性[J].实用检验医师杂志,2012,4(4):256-258.
- 5 张方锦,刘爱民,林茂阳.血涂片镜检在血常规检验中的重要作用[J].世界最新医学信息文摘,2017,17(82):130-131.
- 6 王艳艳.药物对常用临床生化检验指标结果的影响及对策[J].中国实用医药,2016,11(5):122-123.
- 7 姜峻,王森钰,邱卫强.抗凝剂校正公式在凝血四项检测中的应用[J].实用检验医师杂志,2014,6(3):189-191.
- 8 刘志兰,杨彬,赵宝忠.血细胞涂片瑞氏染色法缓冲液的选择[J].临床检验杂志,2011,29(4):252-253.
- 9 赵先进,李秀梅,孙磊.做好显微镜形态学室间质评的体会与思考[J].实用检验医师杂志,2011,3(1):58-59.

(收稿日期:2018-04-12)

(本文编辑:张耘菲)