

中华人民共和国卫生行业标准

WS/T 632—2018

巴贝虫检测 血涂片镜检法

Detection of *Babesia* spp.—Blood smear microscopy examination method

2018 - 09 - 26 发布

2019 - 04 - 01 实施

中华人民共和国国家卫生健康委员会 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由国家卫生标准委员会寄生虫病标准专业委员会提出。

本标准起草单位：中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所、第二军医大学、中国农业科学院上海兽医研究所。

本标准起草人：张仪、周晓农、刘琴、陈韶红、朱淮民、周金林。

巴贝虫检测 血涂片镜检法

1 范围

本标准规定了检测巴贝虫的血涂片镜检法。

本标准适用于各级疾病预防控制机构和医疗机构对巴贝虫的检测。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅所注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

WS/T 569 疟原虫检测 血涂片镜检法

WS/T 564 巴贝虫病诊断

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

巴贝虫 *Babesia* spp.

一类寄生于人和脊椎动物红细胞内的原虫，可引起巴贝虫病（Babesiosis）。感染人体的巴贝虫有田鼠巴贝虫(*Babesia microti*)、分歧巴贝虫(*B. divergens*)、邓肯巴贝虫(*B. duncani*)和猎户巴贝虫(*B. venatorum*)等。

3.2

血涂片 blood smears

将血液涂制于载玻片上制成的涂片，分为厚血膜涂片和薄血膜涂片。

4 仪器和器材

4.1 光学显微镜（100×油镜、10×目镜）

4.2 血涂片染色架

4.3 血涂片干燥架

4.4 玻片盒

4.5 染色盘和染色缸

4.6 计数器

5 试剂和材料

5.1 吉氏染色原液 (Giemsa)

5.2 pH7.2 磷酸盐缓冲液 (PBS)

5.3 标准级载玻片 (洁净载玻片, 或表面带正电荷的粘附玻片)

5.4 甲醇 (分析纯)

5.5 香柏油或专用浸油 (折射率 ≥ 1.5)

5.6 二甲苯 (分析纯)

5.7 甘油

6 检测步骤

6.1 血涂片的制作

6.1.1 采血部位及取血方法

末梢(无名指指尖或耳垂)取血。用75%酒精棉球消毒取血部位,待酒精挥发后,用拇指和食指紧捏耳垂上方或无名指指尖,另一只手手持一次性采血针迅速刺入皮肤,轻轻挤压出血。婴儿可从拇趾或足跟扎刺取血。

6.1.2 厚血膜制作

取1张已消毒的载玻片(或粘附玻片)作推片,用推片的一角,取 $4\mu\text{L}\sim 5\mu\text{L}$ 的血量,使血与另一张平置的载玻片(或粘附玻片)中央偏右的位置接触,由里向外旋转,画2圈~4圈,涂成直径 $0.8\text{cm}\sim 1\text{cm}$ 大小圆形厚血膜(见附录A)。

6.1.3 薄血膜制作

干棉球抹净推片下角的血渍,用同一张推片中部取约 $1\mu\text{L}\sim 1.5\mu\text{L}$ 的血量。将血置于离厚血膜左边缘约 0.3cm 的位置,推片的边缘紧贴载玻片,上下轻轻移动,使血沿推片的边缘散开至 2cm 宽,使两张玻片保持 $25^\circ\sim 35^\circ$ 角,从右向左迅速推动推片向前,推成舌状薄血膜(见附录A)。

6.1.4 编号

血涂片制好后水平放置,充分干燥后,在玻片一侧毛玻璃上或在靠近厚血膜一端边上标注编号和日期。

6.2 固定与溶血

6.2.1 薄血膜固定

将薄血膜一端朝下呈 45° 角,用一次性吸管吸取甲醇溶液,均匀轻抹于薄血膜表面,避免碰触厚血膜。

6.2.2 厚血膜溶血

在干燥的厚血膜上滴加蒸馏水数滴，完全覆盖血膜，溶血数分钟，待血膜呈浅灰色，倾去溶血血液。

6.3 吉氏染色

6.3.1 吉氏染液的配制

常用的吉氏染液工作液包括 2%、3%、10% 三种浓度，分别由吉氏染液原液和 pH 7.2 磷酸盐缓冲液（PBS）按比例配制，也可购买商品化吉氏染液原液加实验用纯水按比例配制（见附录 B）。

6.3.2 吉氏染色

染色方法见附录 B

6.4 显微镜检查

在染色后的血涂片上加 1 滴香柏油或专用浸油，用 100×（倍）油镜、10×（倍）目镜的光学显微镜检查。观察血片路线顺序为薄血膜从尾部舌尖部分开始，厚血膜从上端或下端开始（见附录 A）。

6.5 结果判定

6.5.1 巴贝虫检测阳性

血膜中发现巴贝虫判定为阳性（参见附录 C）。

6.5.2 巴贝虫染虫率计数

6.5.2.1 薄血膜的巴贝虫染虫率计数法

显微镜下检查薄血膜，计数每个视野中的染虫红细胞和红细胞总数 2 000 个以上。用下式计算巴贝虫染虫率。

$$\text{巴贝虫染虫率} = \frac{\text{染虫红细胞}}{\text{红细胞总数}} \times 100\%。$$

6.5.2.2 厚血膜的巴贝虫染虫率计数法

若染虫率低于 0.1% 时，显微镜下检查整张厚血膜片，计数整张厚血膜片的巴贝虫虫体数和红细胞总数。用下式计算巴贝虫染虫率。

$$\text{巴贝虫染虫率} = \frac{\text{整张厚血膜片的巴贝虫虫体数}}{\text{红细胞总数}} \times 100\% \quad (\text{红细胞数男性按 } 500 \text{ 万个}/\mu\text{L 血、女性按 } 450 \text{ 万个}/\mu\text{L 血计算})。$$

附录 A
(规范性附录)
操作示意图

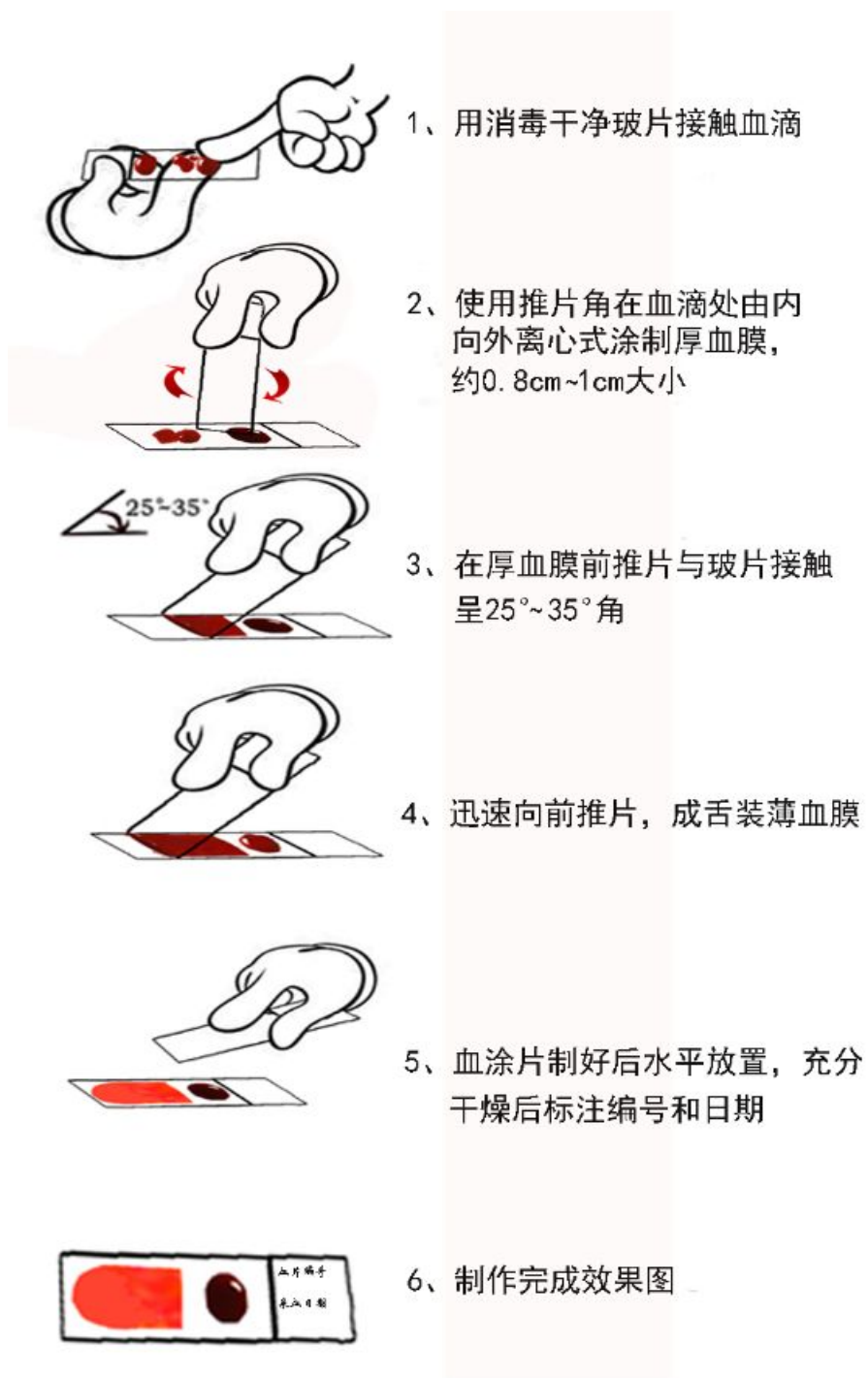


图 A.1 厚薄血膜血涂片的制作过程示意图

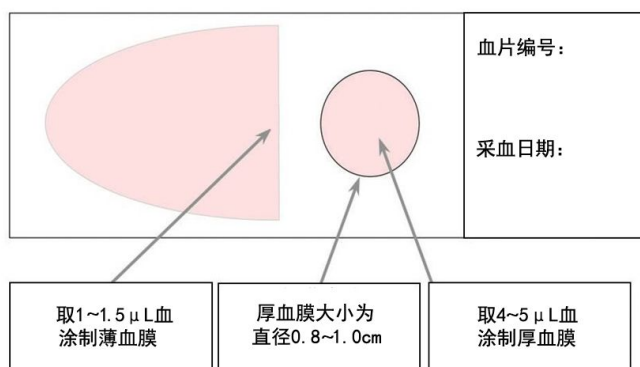


图 A. 2厚薄血膜血涂片的制作示意图



图 A. 3厚薄血膜血涂片的读片示意图

附录 B
（规范性附录）
试剂配制与血涂片染色、保存方法

B.1 吉氏染色原液配制

将 5.0 g 吉氏粉置于研钵中，加入少量甘油充分研磨，然后边加边磨，至 250 mL 甘油加完为止，倒入 500 mL 有塞深色玻璃瓶中。在研钵中加入少量甲醇，洗掉剩余部分，倒入瓶内，再次加甲醇，洗后再倒入瓶中，至 250 mL 甲醇洗净研钵中甘油为止。置室温内，避免阳光直射。塞紧瓶塞，避免蒸发和高湿造成的氧化。每天用力摇动溶液 5 min，3 d 后即可使用，储存时间越久染色效果越佳。根据日常的需求，用干燥吸管吸取少量的染色原液到密闭的分装瓶中（大约 25 mL）。切勿向原液中加入水。

B.2 pH 7.2 磷酸盐缓冲液（PBS）的配制

称量 8.0 g NaCl, 0.2 g KCl, 0.24 g KH₂PO₄（或者 1.44g Na₂HPO₄）和 1.8 g K₂HPO₄，溶于 800 ml 蒸馏水中，用HCl调节溶液的 pH值至 7.2，最后加蒸馏水定容至 1 L。保存于 4℃冰箱中备用。

B.3 吉氏染色工作液配制

B.3.1 2% 吉氏染液工作液的配制

在 98 mL pH 7.2 磷酸盐缓冲液中加入 2 mL 吉氏染色原液并混匀，或 98 mL 实验用纯水中加入 2 mL 商品吉氏染色原液并混匀。

B.3.2 3% 吉氏染液工作液的配制

在 97 mL pH 7.2 磷酸盐缓冲液中加入 3 mL 吉氏染色原液并混匀，或 97 mL 实验用纯水中加入 3 mL 商品吉氏染液原液并混匀。

B.3.3 10% 吉氏染液工作液的配制

在 90 mL pH 7.2 磷酸盐缓冲液中加入 10 mL 吉氏染色原液并混匀，或 90 mL 实验用纯水中加入 10 mL 商品吉氏染液原液并混匀。

B.3.4 注意事项

吸取吉氏染色原液时切勿摇晃盛染色原液瓶子。吉氏染色工作液应现用现配，切勿将未用完的吉氏染色工作液倒回原液瓶中。

B.4 单张血涂片染色法

单张血涂片吉氏染色常用于临床巴贝虫病患者的巴贝虫显微镜检测。采用 3% 吉氏染液染色 30 min 或更长时间。该染色法染色的血涂片可长期保存。也可采用 10% 吉氏染液染色 8 min~10 min，但该染色法染色的血涂片不适合长期保存。

B.4.1 3% 吉氏染液染色法

B.4.1.1. 把经甲醇固定的薄血膜涂片充分干燥后，血膜面朝上水平放置在染色盘中。

B.4.1.2. 用吸管吸取新配制的 3% 吉氏染液 3 mL 左右，滴加于厚、薄血膜上，至染液均匀覆盖血膜，不溢出为止。

B.4.1.3. 静置染色约 30 min。

B.4.1.4. 将染色盘移至冲水池，用缓慢流水沿血涂片上缘冲洗 1 min。

B.4.1.5. 将染色后的血涂片血膜面朝下插入血片干燥架，晾干。

B.4.2 10% 吉氏染液快速染色法

B.4.2.1. 把经甲醇固定的薄血膜涂片充分干燥后，血膜面朝上水平放置在染色盘上。

B.4.2.2. 用吸管吸取新配制的 10% 吉氏染液约 3 mL，滴加于厚、薄血膜上，至染液均匀覆盖血膜，不溢出为止。

B.4.2.3. 静置染色 8 min ~ 10 min。

B.4.2.4. 将染色盘移至冲水池，沿血涂片上缘用缓慢流水冲洗 1 min。

B.4.2.5. 将染色后的血涂片血膜面朝下插入血片干燥架，晾干。

B.5 成批血涂片染色

成批血涂片染色常用于人群流行病学调查中的巴贝虫显微镜检测，一般采用 2% 吉氏染液进行批量血涂片染色。

B.5.1. 将每张血涂片的血膜朝一个方向插入染色缸中，或将每对血涂片的血膜朝外插入染色缸中。

B.5.2. 倒入新配制的 2% 吉氏染液浸没厚、薄血膜。

B.5.3. 静置染色 30 min 以上。

B.5.4. 向染色缸中注入自来水至溢出，除去染液表面浮渣，将染色缸中残余的染液倾出，加入自来水，缓慢冲洗 2 次 ~ 3 次。

B.5.5. 取出血涂片，血膜面朝下插入血片干燥架，晾干。

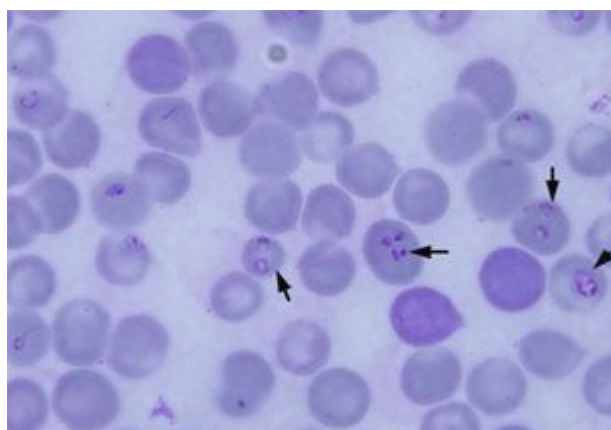
B.6 血涂片保存

用吸水纸吸去已检血涂片血膜表面的香柏油，在血膜上滴加 2 滴 ~ 3 滴二甲苯，然后用吸水纸吸干。置血涂片于玻片盒内，避光、干燥和阴凉保存，以备复核。注意：专用浸油无需用二甲苯清洗，可直接用吸水纸吸干。

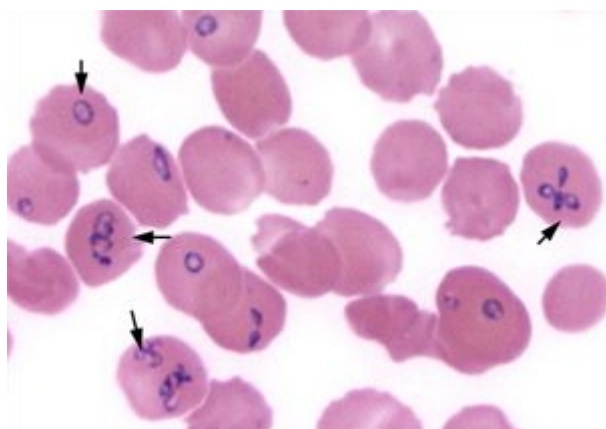
附录 C
(资料性附录)
形态学

C.1 形态

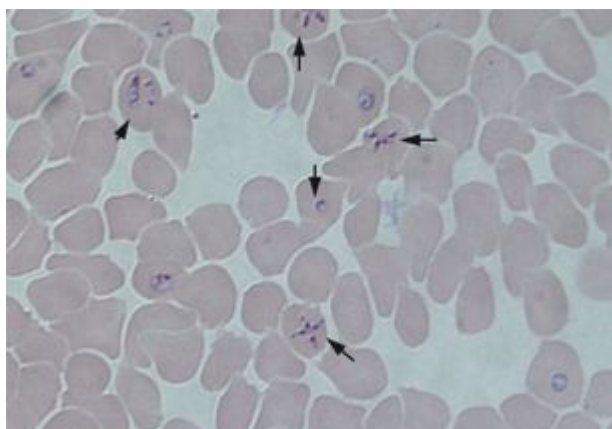
巴贝虫在红细胞内寄生时形态具有多样性。常见虫体形态有环形、圆形、杆形、点状、梨形、阿米巴形等。典型形态为梨形，往往在一个红细胞内有多个虫体寄生，以 1 个~ 4 个虫体居多，可形成三联体或四联体型，即马尔他十字形，且可为不同发育时期的虫体。经吉氏染色后，胞浆呈蓝色，核呈紫红色。



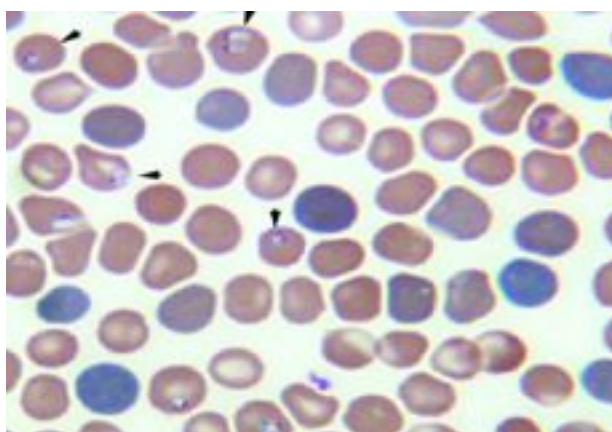
图C.1 薄血膜片中田鼠巴贝虫



图C.2 薄血膜片中分歧巴贝虫 (引自Mørch K, Holmaas G, Frolander, et al. Severe human *Babesia divergens* infection in Norway. Int J Infect Dis, 2015, 33:37-38)



图C.3 薄血膜片中邓肯巴贝虫



图C.4 薄血膜片中猎户巴贝虫（引自Sun Y, Li SG, Jiang JF, et al. *Babesia venatorum* Infection in Child, China. *Emerg Infect Dis*, 2014, 20(5):896-897）

参 考 文 献

- [1] 刘恩勇, 赵俊龙. 巴贝斯虫病 (第一版) [M]. 武汉: 湖北人民出版社 2001, 21-30.
- [2] 吴观陵. 人体寄生虫学 (第4版) [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2013, 233-237.
- [3] WS/T 569 疟原虫检测 血涂片镜检法.
- [4] Zhou X, Xia S, Huang JL, et al. Human babesiosis, an emerging tick-borne disease in the People's Republic of China[J]. *Parasites & Vectors* 2014, 7:509.
- [5] Mørch K, Holmaas G, Frolander, et al. Severe human *Babesia divergens* infection in Norway[J]. *Int J Infect Dis*, 2015, 33:37-38.
- [6] Sun Y, Li SG, Jiang JF, et al. *Babesia venatorum* Infection in Child, China[J]. *Emerg Infect Dis*, 2014, 20(5):896-897.
- [7] WS/T 564 巴贝虫病诊断.
-