

WS

中华人民共和国卫生行业标准

WS/T 10018—2024

## 利什曼原虫检测 涂片镜检法

*Leishmania* detection Smear microscopy

2024 - 10 - 11 发布

2025 - 03 - 01 实施

国家疾病预防控制局 发布

## 前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件由国家疾病预防控制标准委员会寄生虫病标准专业委员会提出，国家疾病预防控制局归口。

本文件起草单位：中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所（国家热带病研究中心）、首都医科大学附属北京友谊医院、四川省疾病预防控制中心、浙江省疾病预防控制中心、上海交通大学医学院附属瑞金医院。

本文件主要起草人：高春花、郑彬、汪俊云、邹洋、刘阳、姚立农、王剑飏、危芙蓉、俞铖航。

# 利什曼原虫检测 涂片镜检法

## 1 范围

本文件描述了骨髓和皮肤组织液涂片镜检法检测利什曼原虫的检测方法。  
本文件适用于各级疾病预防控制机构和医疗机构对人体利什曼原虫的显微镜检测。

## 2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；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 233 病原微生物实验室生物安全通用准则

## 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

### 3.1

**利什曼原虫** *Leishmania* spp.

一类可以引起利什曼病的寄生性的单细胞真核生物。不同种利什曼原虫感染可导致人内脏利什曼病（visceral leishmaniasis）或称黑热病（kala-azar）、皮肤利什曼病（cutaneous leishmaniasis）或黏膜皮肤利什曼病（mucocutaneous leishmaniasis）。

### 3.2

**利什曼原虫无鞭毛体** *Leishmania amastigote*

寄生于人体和哺乳动物单核巨噬细胞内的利什曼原虫，其鞭毛萎缩而不可见，虫体呈圆形或卵圆形，无运动能力。

### 3.3

**骨髓涂片** bone marrow smear

骨髓穿刺液涂于载玻片上制成的涂片。

### 3.4

**皮肤组织液涂片** dermal tissue fluid smear

皮肤组织液涂于载玻片上制成的涂片。

## 4 仪器设备

4.1 光学显微镜（100×油浸物镜、10×目镜）。

4.2 涂片染色架。

4.3 涂片干燥架。

4.4 染色盘。

4.5 医疗污物桶。

## 5 试剂或材料

5.1 吉氏粉。

5.2 瑞氏粉。

5.3 pH7.2 磷酸盐缓冲液（phosphate buffer saline, PBS）。

- 5.4 甲醇（分析纯）。
- 5.5 专用浸油或香柏油（折射率 $\geq 1.5$ ）。
- 5.6 二甲苯（分析纯）。
- 5.7 载玻片（无划痕无油污的洁净载玻片）。

## 6 检测步骤

### 6.1 涂片的制作

#### 6.1.1 编号

取3张洁净载玻片，分别在每张玻片一侧标注编号。

#### 6.1.2 骨髓涂片的制作

对于疑似内脏利什曼病患者，采用骨髓穿刺方法采集骨髓。立即在距离每张载玻片编号端1/3处滴加约20 $\mu$ L骨髓穿刺液，另取1张边缘光滑的载玻片作为推片，将推片下缘平抵骨髓穿刺液前侧，当骨髓穿刺液在载玻片与推片之间向两侧扩展至约2cm宽时，使2张玻片保持25°~35°角，从编号端向另一端迅速推成舌状涂片（见附录A）。室温干燥。

#### 6.1.3 皮肤组织液涂片的制作

对于疑似皮肤利什曼病患者，在皮肤结节边缘或者皮肤溃疡处吸取或刮取组织液，置于载玻片上（每张载玻片5 $\mu$ L~20 $\mu$ L），按上述方法制作涂片。室温干燥。

### 6.2 染色液的配制

#### 6.2.1 吉氏染液的配制（见附录B）。

#### 6.2.2 瑞氏染液的配制（见附录B）。

### 6.3 涂片染色

用吉氏染液或瑞氏染液染色，染色方法和涂片保存见附录C。

### 6.4 镜检

在染色晾干后的涂片上加1滴专用浸油或香柏油，在光学显微镜（100 $\times$ 油浸物镜、10 $\times$ 目镜）下检查。

## 7 结果判定

### 7.1 利什曼原虫检测阳性

涂片中查到利什曼原虫无鞭毛体，该涂片判定为阳性（见附录D）。

### 7.2 利什曼原虫检测阴性

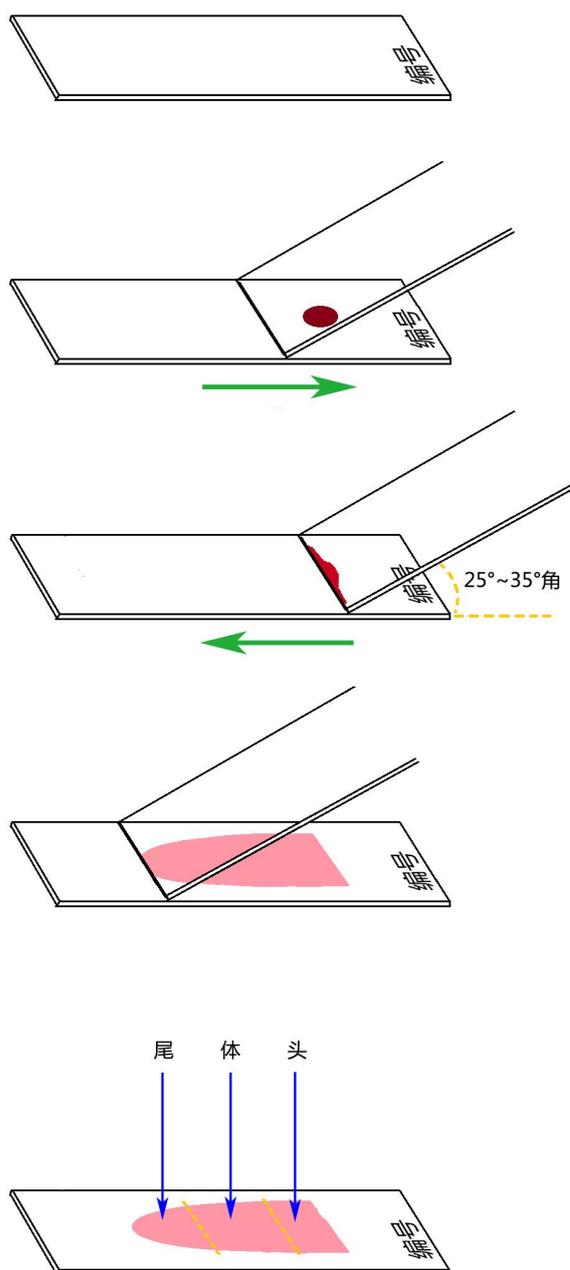
观察1000个以上视野而没有发现利什曼原虫无鞭毛体，该涂片判定为阴性。

## 8 废弃物处理

所有样品、洗涤液和各种废弃物均应按照WS 233病原微生物实验室生物安全通用准则的规定进行处理。

附录 A  
(资料性)  
涂片的制作方法示意图

骨髓和皮肤组织液涂片制作示意图见图A.1。



1. 在玻片一侧编号。
2. 在距离玻片编号端1/3处滴加约20  $\mu\text{l}$ 骨髓穿刺液或5  $\mu\text{l}$  ~ 20  $\mu\text{l}$ 皮肤组织液，推片下缘平抵液滴前侧。
3. 当液滴在两张玻片间扩展至约2 cm时，使两张玻片保持25° ~ 35°角。
4. 将推片迅速从编号端向另一端推进。
5. 涂片可分为头、体、尾三部分，在尾部舌状区域易检出利什曼原虫无鞭毛体。

图 A.1 涂片制作示意图

## 附录 B (资料性) 染液的配制

### B.1 吉氏染液配制

#### B.1.1 吉氏染色原液的配制

吉氏粉5.0g, 甲醇250mL, 甘油250mL。

将吉氏粉置于研钵中, 加入少量甘油充分研磨, 然后边加边磨, 至甘油加完为止, 而后倒入500mL具塞深色玻璃瓶中。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, 至甲醇洗净研钵中甘油为止。塞紧瓶塞, 置室温内, 每天用力摇动溶液5min, 3d后即可使用。

注意事项: 将瓶塞塞紧, 以免蒸发和高湿造成的氧化; 配制的原液储存于深色玻璃瓶中, 避免阳光直射。切勿向原液中加入水。

#### B.1.2 pH 7.2 磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer saline, PBS) 的配制

先制备好两种贮备溶液:

——溶液 I 为 9.5g 无水磷酸氢二钠加蒸馏水至 1000mL;

——溶液 II 为 9.07g 磷酸二氢钾加蒸馏水至 1000mL。

制备时将磷酸盐置于容量瓶中, 加入部分蒸馏水摇匀使溶解后, 再加入蒸馏水定容至1000mL, 充分摇匀, 塞紧备用。临用时, 取73mL溶液I和27mL溶液II, 倒入1000mL容量瓶中, 加入部分蒸馏水, 混合摇匀后, 再加入蒸馏水定容至1000mL, 塞紧瓶塞反复摇匀后, 即配制成pH7.2的磷酸盐缓冲溶液。

#### B.1.3 3%吉氏染液的配制

在97mL pH7.2磷酸盐缓冲液中加入3mL吉氏染色原液并混匀。

### B.2 瑞氏染液的配制

#### B.2.1 瑞氏染液的配制

瑞氏粉1.0g, 甲醇(分析纯)600mL。

将全部染料置于研钵中, 先加少量甲醇慢慢地研磨(至少0.5h), 以使染料充分溶解, 再加一些甲醇混匀, 然后倒入洁净的1000mL具塞深色玻璃瓶中。在研钵中仍剩有尚未溶解的染料, 再加入少量甲醇细研, 如此多次研磨, 直至染料全部溶解, 甲醇用完为止。

#### B.2.2 pH 6.4~pH 6.8 磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer saline, PBS) 的配制

先制备好两种贮备溶液:

——溶液 I 为 10g 无水磷酸氢二钠加蒸馏水至 1000mL;

——溶液 II 为 10g 磷酸二氢钾加蒸馏水至 1000mL。

制备时将磷酸盐置于容量瓶中, 加入部分蒸馏水摇匀使溶解后, 再加入蒸馏水定容至1000mL, 充分摇匀, 塞紧备用。临用时, 取30mL溶液I和 80mL溶液II, 倒入1000mL容量瓶中, 加入部分蒸馏水, 混合摇匀后, 再加入蒸馏水定容至1000mL, 塞紧瓶塞反复摇匀后, 即配制成pH 6.4~pH 6.8的磷酸盐缓冲溶液。

缓冲液发生沉淀时, 需重新配制。

## 附录 C (资料性) 染色方法和涂片保存

### C.1 吉氏染液的染色方法

#### C.1.1 固定

应用吉氏染液染色前，涂片需固定。待涂片干燥后用玻璃棒蘸取甲醇溶液，均匀轻抹于涂片表面，自然晾干。

#### C.1.2 染色

将经甲醇固定干燥后的涂片涂膜面向上水平放置在染色盘中。用吸管吸取新配制（不超过 24 h）的3%吉氏染液约3mL，滴加于涂片上，使染液均匀布满整个涂片但不溢出为止。静置染色约30min。将染色盘移至冲水池，用缓慢流水沿涂片上缘冲洗约1min。自然晾干。

#### C.1.3 注意事项

染色后不要直接将染液倒掉，将涂片连同染液一起放在水中漂洗，或沿玻片及染色缸边缘加水，使染液表层溢出，并轻轻冲洗，以免染液色素颗粒玷污涂片。

### C.2 瑞氏染液的染色方法

#### C.2.1 染色

将干燥后的涂片平放于染色盘中，用吸管将染液滴于涂片上，使染液布满整个涂片。稍等或立即加入缓冲液，并使缓冲液与染液混合均匀，静置染色约10min~30min。将染色盘移至冲水池，用流水冲洗。自然晾干。

#### C.2.2 注意事项

##### C.2.2.1 染液与缓冲液的比例

缓冲液和染液量要充足，否则染液很快蒸发，染料沉淀于细胞上，使细胞深染而无法检查。通常，一张骨髓片约需染液 3滴~5滴（150 $\mu$ L~250 $\mu$ L），染液与缓冲液之比为1:2~1:7。一般情况下，缓冲液稀释度越大，染色时间越长，细胞着色越匀称、鲜亮。

##### C.2.2.2 染色时间

通常染色约需10min~30min。具体视涂片厚薄而定。骨髓涂片含有核细胞较多，细胞较幼稚，染色时间宜长些。有时需将载有染液的玻片置于显微镜的低倍镜下观察，待其有核细胞染色清晰，核浆红蓝分明时，方可冲洗。

##### C.2.2.3 冲洗

染色后涂片上的染液可用水冲洗，但要轻轻晃动涂片，平持玻片缓慢冲洗，将染液沉渣浮起冲走，切勿先倾去染液再用水冲，以免染料沉淀在涂膜上。冲洗后涂片竖立在干燥架上，在空气中自然干燥或风干，切忌火烤。

### C.3 涂片保存

用吸水纸吸去已检涂片表面的专用浸油或香柏油，滴加2滴~3滴（100 $\mu$ L~150 $\mu$ L）二甲苯，然后用吸水纸吸干（专用浸油无需用二甲苯清洗，可直接用吸水纸吸干）。置涂片于玻片盒内，避光、干燥和阴凉保存，以备复核。

吉氏染液染色的涂片可保存3年以上，而瑞氏染液染色的涂片保存时间较短（1年）。

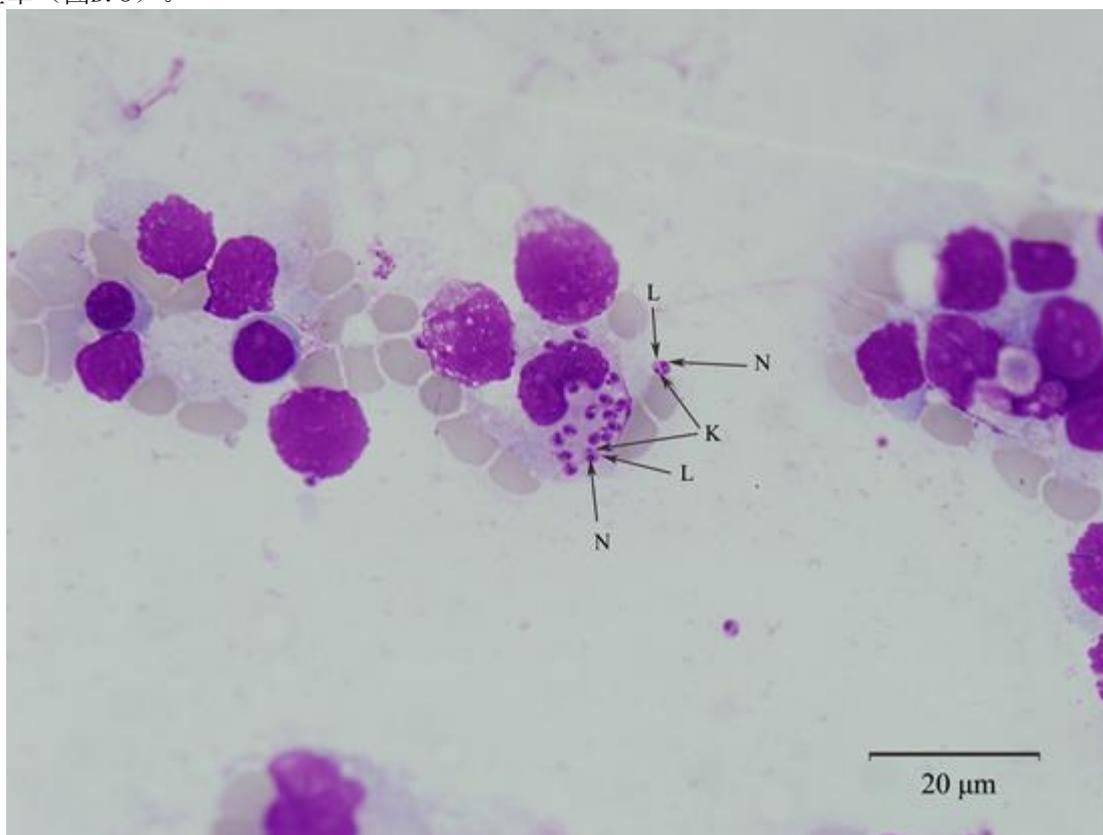
## 附录 D

(资料性)

## 利什曼原虫无鞭毛体形态及其与荚膜组织胞浆菌的鉴别

利什曼原虫无鞭毛体呈圆形或卵圆形，位于巨噬细胞内或细胞外，无鞭毛体的胞浆内含有一个紫红色的细胞核和一个较小但着色更深（深紫红色）的动基体，细胞质则呈浅蓝色（图D.1和图D.2）。

播散性组织胞浆菌病大都发生在我国南方，临床表现与黑热病极为相似，有肝、脾肿大，发热，贫血等，其病原体荚膜组织胞浆菌（*Histoplasma capsulatum*, *H. cap*）亦寄生于巨噬细胞内，涂片中观察到的形态也与利什曼原虫无鞭毛体相似。但荚膜组织胞浆菌较利什曼原虫无鞭毛体稍大，外膜较厚，菌体内无特定构造，无动基体及细胞核类似结构，且在染色后因胞壁收缩而在菌体周围出现一层未着色的空晕（图D.3）。



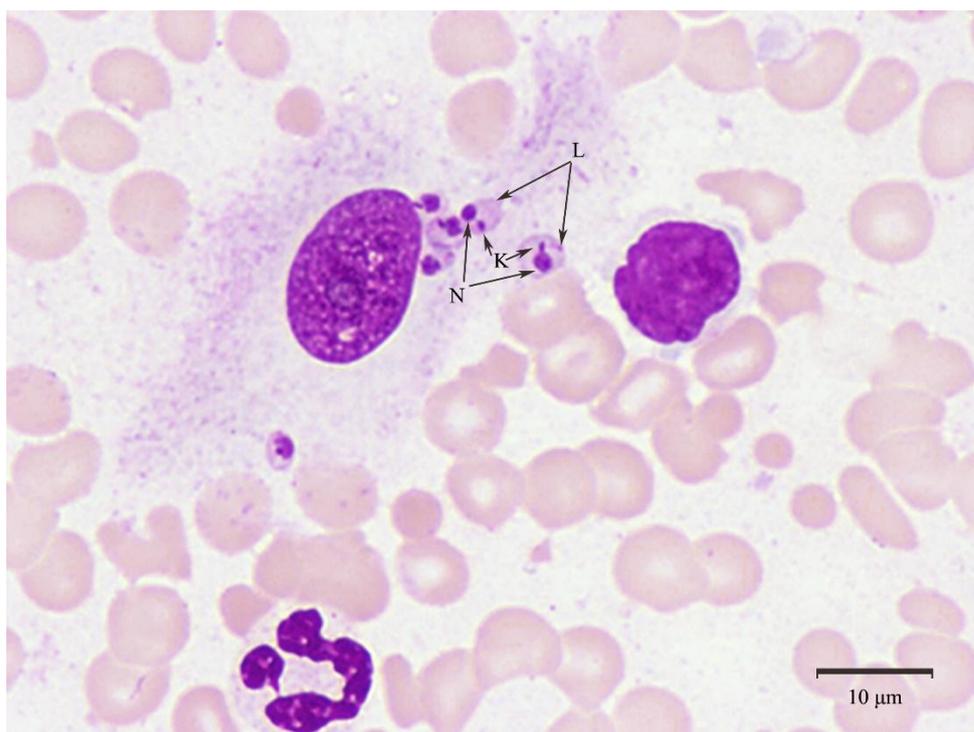
标引符号说明：

L——利什曼原虫无鞭毛体；

N——细胞核；

K——动基体。

图 D.1 内脏利什曼病患者骨髓涂片（吉氏染色，100×油浸物镜、10×目镜）



标引符号说明：  
L: 利什曼原虫无鞭毛体；  
N: 细胞核；  
K: 动基体。

图 D.2 皮肤利什曼病患者皮肤组织液涂片（吉氏染色，100×油浸物镜、10×目镜）

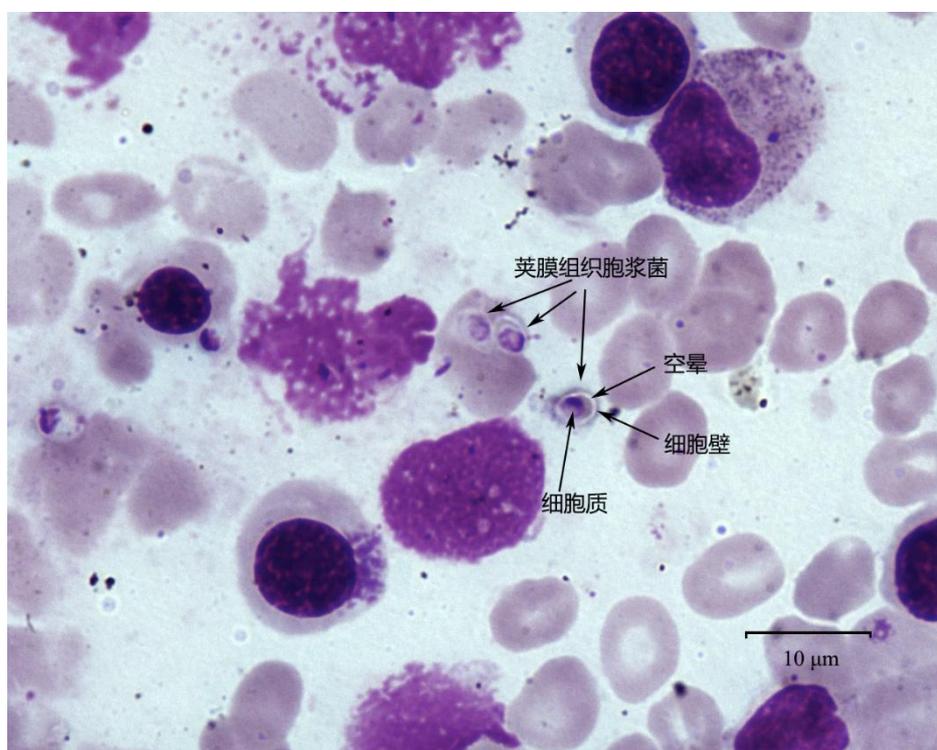


图 D.3 荚膜组织胞浆菌病患者骨髓涂片（吉氏染色，100×油浸物镜、10×目镜）

### 参 考 文 献

- [1] WS 258—2006 黑热病诊断标准.
  - [2] 柴君杰, 管立人. 新疆维吾尔自治区的利什曼病与白蛉. 乌鲁木齐: 新疆人民出版社, 2006.
  - [3] WHO Technical Report Series/949 Manual on Visceral Leishmaniasis Control. WHO Geneva, 2010.
  - [4] Technical Report Series The Leishmaniases. WHO, Geneva, 1984.
  - [5] 万学红, 卢雪峰. 诊断学. 第9版. 北京: 人民卫生出版社, 2018.
-