

혈액내 말라리아원충을 관찰하기 위한 표본제작법

윤철종, 이송국, 정수경*

서울대학교병원 소아병리과, 고려대학교 보건대학 임상병리과*

말라리아는 적혈구내에서 증식하는 원충류로서 이를 혈액을 유리 슬라이드에 도말에서 염색을 통한 감별방법은 오래 전부터 광학현미경에서 사용해 온 방법이었다. 그러나 전자현미경으로 관찰을 위한 방법은 유리 슬라이드에 도말을 통해서 관찰이 어렵기 때문에 이들 혈액을 원심분리법을 통한 말라리아 원충을 보기 위한 방법을 소개하고자 한다. 말라리아 감염이 의심되는 환자 6명에서 전혈을 5ml 채취하여 EDTA로 항응고처리된 채혈관에 담아 원심분리기(Hitachi, SCT4BD)에서 3000rpm으로 약 15분간 원심분리를 한 후 피펫으로 혈장을 제거하고 0.1M 인산완충액으로 3회 반복하여 여분의 혈장을 제거 후 2.5% 글루타알데하이드 용액을 시험관 벽을 따라 서서히 고정액을 넣는다. 냉장고에 약 30분 방치 후 피펫으로 먼저 넣은 고정액을 제거하고 신선한 2.5% 글루타르알데하이드 용액으로 채운다. 다시 30분 후 buffy coat 층을 시험관 벽을 따라 박리하여서 바이알 병에 옮긴다. 1mm 두께의 원반 모양의 표본을 약 1mm X 3mm로 잘라서 얻어진 표본을 0.1M 인산완충액으로 수세하고 1% 사산화 오스미움에서 1시간 30분 정도 후고정을 실시하고 에탄올 고농도 순으로 탈수 후 에폭시 수지(Polybed 812 kit, Polyscience Inc.)에 포매하고 80 °C 오븐에서 16시간동안 중합반응을 거쳐 블록을 얻었다. 초박절편기로 1 μ m 두께의 절편을 만든 후 툴루이딘 블루염색을 거쳐 비교적 백혈구 층이 넓게 관찰되는 부위를 초박절편을 만든 후 전자염색을 하고 전자현미경(Hitachi, H-600)으로 50kv에서 말라리아 원충들을 관찰하였다. 적혈구내의 감염된 trophozoite 원충은 적혈구의 비중과 비슷한 관계로 적혈구층의 상부에 존재하였으며 독자적인 merozoites는 백혈구와 같은 층에서 관찰되었다. 본 연구는 혈액내의 말라리아를 모아서 광학현미경 및 전자현미경으로 관찰하는 방법으로는 원심분리를 통하여 표본제작을 하는 것이 좋다고 생각된다.

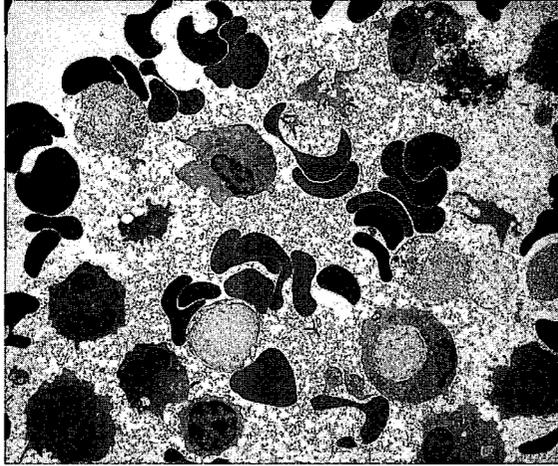


Fig.1. Electron micrograph showing merozoites of malaria and blood cells in the buffy coat layer. X 1,500

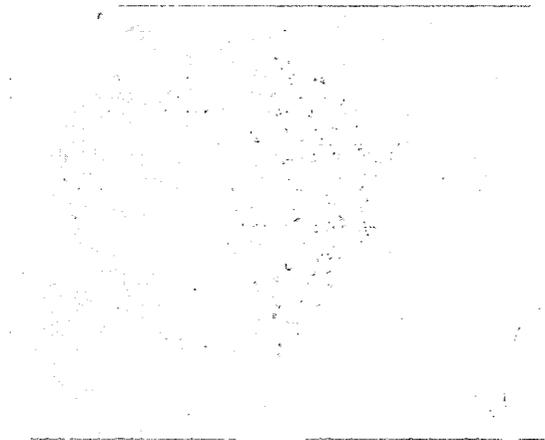


Fig.2. Electron micrograph showing trophozoite form in the RBC. X 10,000