

임상수의사에게 필요한 진단방법

— 현미경 사용법 및 혈액검사 —

김진수·김기택

말도 하지 못하는 동물의 건강상태 및 질병을 진단, 치료하기 위하여 병력(History), 신체검사(Physical examination, 실험실 검사(Laboratory test), X-ray/초음파 검사, 내시경 검사 등등 여러가지 방법을 이용하여 시험하고 그 결과를 종합한 후 진단을 하고 치료계획을 세우는 것이 우리 수의사들의 하는 일이라 할 수 있습니다. 모든 진단과정 및 방법이 중요하지만 시간적, 기술적 또는 경제적인 이유로 모든 동물에 전과정을 적용할 수 없기 때문에 경제적이고 간편한 현미경을 통한 혈액검사 방법을 소개하고자 합니다.

현미경은 크게 3 부분으로 구분할 수 있고, 이를 세분하면 light source, condenser, mirror, diagram, stage 및 eye piece 등으로 구분할 수 있습니다. 현미경을 사용할 때에는 현미경이 제대로 잘 조정되어 있는지 확인하여야 하며, 이때 사용되는 Köhler illumination technique을 소개합니다(그림 1, 2 참조).

방 법 :

- 1) Condenser를 맨위 즉, 표준 stage로 올린다.
- 2) 10x 렌즈를 통하여 표본의 초점을 맞춘다.
- 3) Condenser를 아래로 움직이면서 초점을 맞춘다.
- 4) Condenser에 달린 2 나사(screws)을 조정하여 light source가 상(image)의 중심에 오도록 한다.
- 5) 접안렌즈(eye piece)을 제거한 후 빛의 70-80%가 관을 통하여 들어오면 현미경이 조정된 것이다.

위의 방법으로 현미경을 조정하면 오래 보아도 눈이 피곤하지 않으며, 표본에 열을 가하지 않고 정확하게 오랫동안 검사할 수 있으며, 앞으로 설명될 방법도

정확하게 이용할 수 있다.

현미경을 통한 혈액검사

혈액은 체내에 산소와 영양공급을 담당하며 혈장, 적혈구, 백혈구, 혈소판 등으로 구성되어 있다. 척추동물이 바다에서 육지로 진화되는 과정에서 혈액의 중요 구성성분인 적혈구도 산소공급 및 체내 pH를 유지하기 위하여 많은 형태학적 변화를 보여왔으며, 이러한 변화가 동물의 질병을 진단하는데 많은 도움을 주고 있다.

백혈구는 체내 방어기전을 하며 Granulocyte 즉, Neutrophil, Eosinophils 그리고 Basophils와 Agranulocyte 즉, Monocytes 그리고 Lymphocytes로 구성되어 있다.

혈액을 검사하는 방법은 매우 다양하며, 그중 대표적인 몇가지만 소개하고자 한다.

1) Counting chamber를 이용하여 현미경을 통해 세포를 일일이 세는 방법으로 간단한 장비로 매우 정확히 알 수 있으나 시간이 많이 걸리고 검사하는 사람이 잘 훈련되어 있어야 한다.

2) QBC Blood tube를 이용한 방법은 QBC Blood tube를 원심분리한 후 Acridine Orange로 염색하여 UV spectrophotometer로 Band를 측정하는 방법으로 Spectrophotometer의 각도에 따라 오차가 생기는 단점을 가지고 있다.

3) Hema Vet System의 경우 혈액을 희석한 후 좁은 관을 통과시키며 각 세포의 크기를 재고 세포의 수를 세는 방법으로 사용하기는 매우 간편하나 미성숙세포

How to set your microscope properly or Köhler illumination does the trick

Advantages:

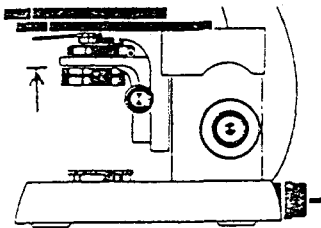
- Evenly illuminated object field.
- Brilliant image without reflections or glare
- Minimum heating of specimen

Light-path requirements :

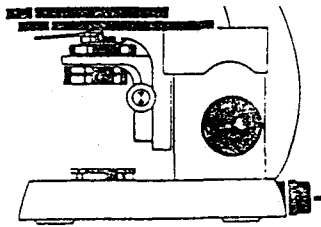
- Lamp field stop image on specimen.
- Objective pupil filled with light.

Equipment required:

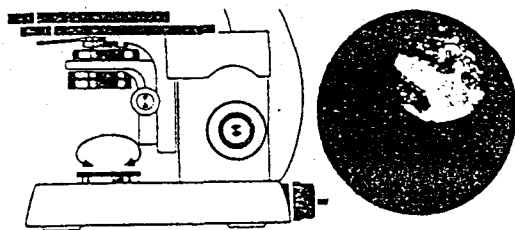
- Vertically adjustable centerable condenser.
- Illuminator with lamp condenser and iris diaphragm.
- In short, a standard Zeiss microscope.



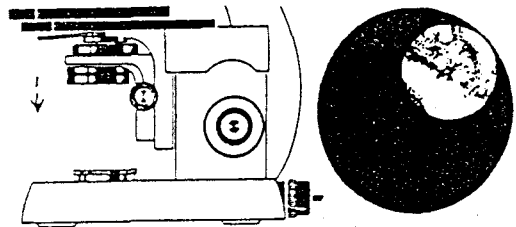
1. Fully rack up condenser with top lens swung in.



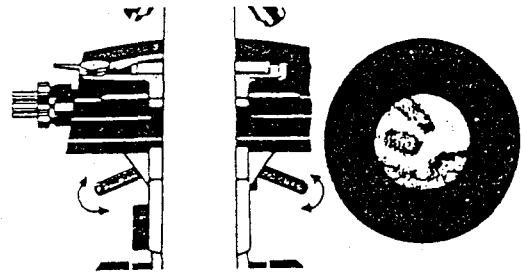
2. Focus on specimen with 10 x 94 16 x objective.



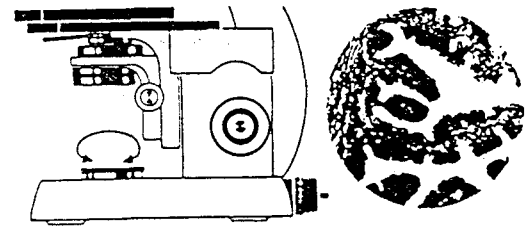
3. While viewing closedown lamp field stop in microscope base.



4. Slightly lower condenser until stop image is in optimum focus.

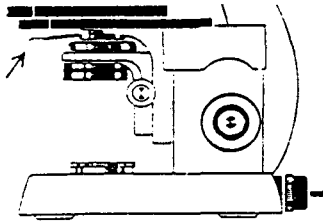


5. Use the two condenser centering screws to center image of field stop in field of view.

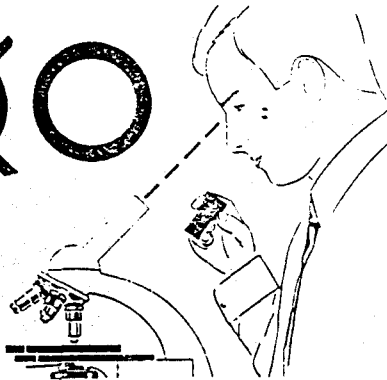


6. Open up field stop close to edge of field of view. fine focus and open further to just clear field of view.

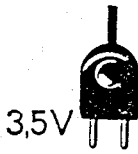
Modifications for phase contrast(Ph)



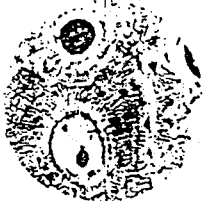
7. Use condenser diaphragm to control image contrast (Ph-condenser in J position)



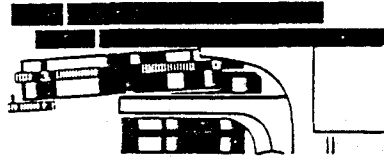
8. Check : Remove eyepiece and look through tube. Three quarters of visible objective aperture should be filled with light.



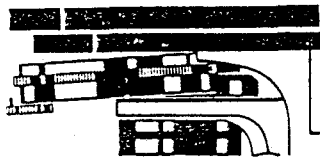
9. Adjust image brightness by means of filters or by varying lamp voltage.



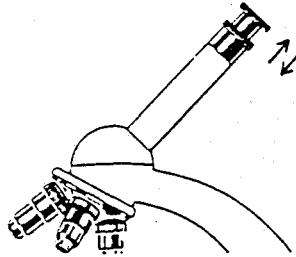
10. After changing objective just adapt lamp field stop to size of visual field and condenser diaphragm to objective aperture.



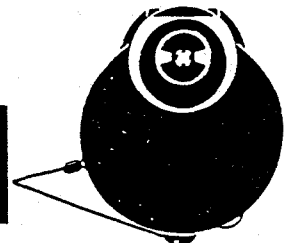
1-6. Same as before but with Ph-condenser in J position.



7. Introduce proper annular condenser diaphragm for Ph-objective used.



8. Replace eyepiece by centering telescope and focus on phase annulus and annular diaphragm (shift upper knurled collar in relation to lower one).



9. Use the two condenser adjusting knobs to bring phase annulus and annular diaphragm into coincidence. Replace eyepiece. Use green filter.

10. After changing objective. just adapt lamp field stop to size of visual field and introduce proper annular diaphragm for objective used.

그림 2.

7th Reading (Final Capillary)

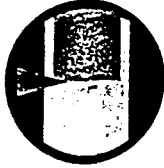
Move tube inward until arrow is at meniscus of TRANSLUCENT GREEN plasma column(7th Reading)



Press ENTER. Record or Print the hematology values

6th Reading (Final Venous)

Move tube inward until arrow tip is at interface between PALE YELLOW layer and TRANSLUCENT GREEN plasma(6th Reading)



Press ENTER. In VENOUS mode Record or Print the hematology value.

5th Reading

Move tube inward until arrow tip is at interface between BRIGHT GREEN and PALE YELLOW layers(5th Reading)



Press Enter

4th Reading

Move tube inward until arrow tip is at top of ORANGE-YELLOW layer or bottom of DARK BAND (4th Reading)



Press Enter

3rd Reading

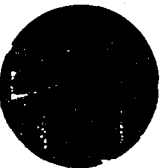
Move tube inward until arrow up is at interface between LIGHT RED and ORANGE-YELLOW laers (3rd Reading)



Press Enter

2nd Reading

Move tube inward until arrow tip is at bright edge of float between Dark Red and LIGHT RED layers (2nd Reading)



Press ENTER. The while tube lamp will turn off.

1st Reading

Move tube inward until arrow tip is at interface between GREEN closure and bottom of RED cells (1st Reading)



Press ENTER. The white tube lamp will light.

그림 3. Reading Procedures for QBC Blood Tubes in Venous and Capillary Modes.

가 많아 세포의 크기가 큰 경우 다른 종류의 세포로 분리되는 단점 뿐만아니라 2)와 같이 혈액분석기의 값이 비싼 단점이 있다.

다음에 소개하고자 하는 방법은 미국의 예를 보아도 같은 나라 또는 인종끼리 모여 살듯이 혈액세포도 같은 크기 또는 특성을 가진 세포끼리 인력(sepecific gravity)에 의하여 같이 모이는 점을 착안하여 세포의 형태학적 변화 뿐만아니라 군집성, 세포수의 증감을 관찰하는데 있다.

방 법

깨끗한 슬라이드 중앙에 소량의 피 한방울을 떨어 뜨리고 커버슬라이드로 덮어서 피가 균일하게 퍼지도록 한다. 많은 양의 피를 사용하며 피가 커버슬라이드 밖으로 새어 나가는 것보다는 소량의 피를 사용하여 커버슬라이드가 충분히 피를 덮고 여분의 공간이 있도록 하는 것이 중요하다. 현미경으로 위의 슬라이드를 관찰하여 보면 정상적인 혈액의 적혈구는 슬라이드 중앙부위에 균등히 밀집되어 있고, 백혈구 등은 슬라이드 가장자리에 밀집되어 있다. 다음의 슬라이드 사진을 보면, 정상적인 동물의 피는 혈구가 균등히 퍼져 있으나(그림 4 참조), 혈관내 용혈(Hemolysis) 또는 혈관의 식균작용(phagocytosis)에 의하여 적혈구가 파괴되었거나 그 과정에 있는 슬라이드의 경우 혈구가 군데군데 응집되어 있고 혈구의 손상 즉, Poiki-

locytosis, autoagglutination 그리고 star shaped particulates를 볼 수 있기(그림 5, 6 참조). 예를 들어 진단기에 물렸거나 물린 경험이 있는 개(犬)에서 열이 나고 다리를 절거나 관절통이 있고 식욕부진 등의 임상 증상을 보이는 경우 혈액검사를 통하여 그림 5 또는 그림 6과 같은 슬라이드 소견을 보았다면 라임병을 의심하고 Tetracycline 또는 Clavamay와 같은 항생제를 투약하며 약 2-3주후 임상소견이 정상이고 그림 4와 같은 정상적인 혈액의 소견을 보였다면 라임병으로 확진하고 완차된 것으로 판단할 수 있다. 위에 기술한 혈액검사의 또하나의 장점은 앞서 말한 바와 같이 병의 진행상태 및 치료반응을 monitor 할 수 있고 treatment index로 사용할 수 있다는 점이다.

임상경험으로 볼 때 그림 5 또는 그림 6과 같은 슬라이드 소견을 보인 동물의 약 80%는 항생제 치료에 매우 효과가 좋았으며 약 20%의 경우 Table 1에서 보듯이 세균 또는 리켓치아 감염이외에도 적혈구의 손상을 유발하는 원인으로 적혈구 기생충, 독성물질 및 면역질환 등 여러가지 요인이 있으므로 보다 적극적인 여러가지 진단방법을 통하여 진단하며 면역질환과 같은 질병의 경우 steroid을 사용하는 것이 좋다.

또한 현미경에 편광프리즘(polarizer)과 이방성 편광여과기(Anisotropic polavizing filter)를 설치하면 크리스탈 또는 유기화학 물질이 반짝이는 것을 볼 수 있어 동물이 화학물질에 중독되었나 쉽게 알 수 있다. 또한 Video micrologica Camera를 한쪽 접안렌즈 관에 설치하여 비디오가 달린 TV에 연결하면 슬라이드를 TV

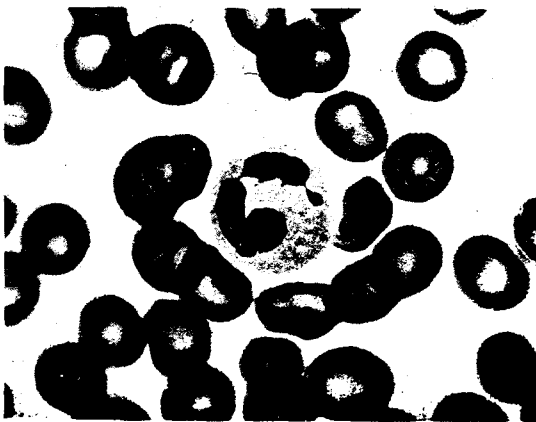


그림 4. 정상적인 동물의 적혈구.

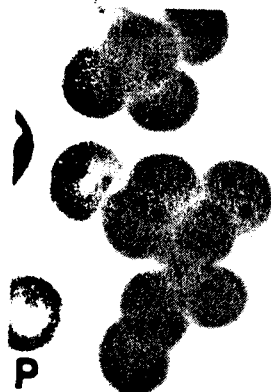


그림 5.

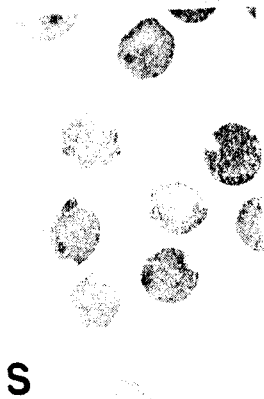


그림 6. 라임병에 감염된 개의 적혈구.

브라운관을 통하여 볼 수 있으며 필요시 축주와 함께 슬라이드를 TV 브라운관을 통하여 보면서 질병 및 예후에 관하여 설명하고 information을 녹화하여 기록으로 보관할 수 있다.

다시 강조하는 점은 현미경 조정이 매우 중요하며 진료시에 청진기를 사용하듯 현미경을 보는 것을 일상화하고 그후 적혈구를 간단하게 검사함으로써 그 응집경향을 보면서 세균감염이 의심될 때는 항생제를 투약하며 그 치료결과에 따라 좀더 정확한 진단을 할 수 있다. 바쁜 수의사에게는 염색을 하면 더욱 Artifact를 만들어 혼돈을 줄 수 있으므로 위에 기술한 간

Table 1. Cause of Accelerated Erythrocyte Destruction

Intravascular hemolysis	Phagocytosis(Extravascular)
Bacteria	RBC parasites
<i>Leptospira</i> spp	<i>Anaplasma</i> spp
<i>Clostridium perfringes</i> , Type A	<i>Hemobartonella</i> spp
<i>Clostridium hemolyticum</i>	<i>Eperythrozoon</i> spp
RBC parasites	Immune mediated
<i>Babesia</i> spp	Autoimmune hemolytic
Chemicals	Lupus erythematosus
Heinz body-type	Equine infectious anemia
Phenothiazine	Intrinsic erythrocytic defect
Onio, rye grass, kale	Pyruvate kinase deficiency
Methylene blue	Porphyris
Acetaminophen	Hereditary stomatocytosis
Phenazopyridine	Fragmentation(microangiopathic)
Copper	Dissminate intravascular coagulation
Ricin(castor bean)	
Hypophosphatemia (postparturient hemoglobinuria)	
Immune mediated	
Neonatal isoerythrolysis	
Incompatible transfusion	
Hypoosmolality	
Cold hemoglobinuria	

단한 혈액검사법에 익숙하여진 후 더욱 진단이 필요한 경우 염색을 하며 슬라이드를 재검사한다면 좋을 것이다.

참고 문헌

1. Ducan J, Prasse K. Veterinary Laboratory Medicine. 2nd ed. Iowa State University, Press, pp3~37, 1996.
 2. Sodeman. Mechanism of disease. WB. Saunders, p149, 1984. 3. Kim, James JS. Reflection of, 1996. 4. Veterinary Value. 2nd ed. The Rocket compendium of veterinary knowledge. Wyman Guin Publisher, pp163~170, 1985.