

本文引文格式:林倩,方庆全,潘苡晴.真菌六胺银染色技术的优化[J].
右江民族医学院学报,2023,45(3):495-498.

【论著与临床报道】

真菌六胺银染色技术的优化

林倩,方庆全,潘苡晴

(厦门大学附属第一医院病理科,福建 厦门 361003)

摘要:目的 探索真菌六胺银染色的优化方案,寻求染色效果佳且环保简便的染色试剂。方法 选取已知真菌感染的阳性病理组织,分别制作成蜡块,通过对比试验,比较不同氧化剂、六胺银染液不同配制方法、不同衬染试剂对六胺银染色质量的影响。结果 真菌感染组织切片使用2%高碘酸水溶液氧化,染色步骤较使用三氧化铬溶液氧化简便,且三氧化铬为高毒致癌物,高碘酸毒性较低,故选择2%高碘酸溶液作为氧化剂更优;六胺银改良配制重复利用法配制六胺银染液较传统配制法简便,对染液的利用率高,可以重复回收使用,较节约成本;1%亮绿染液与苏木素染液均是教材推荐的衬染剂,但亮绿染液的染色效果显著优于苏木素染液。结论 真菌感染组织切片使用2%高碘酸水溶液作为氧化剂、六胺银改良配制重复利用法配制的六胺银液染色、1%亮绿染液衬染为较佳方案。

关键词:真菌;六胺银染色;氧化剂;配制方法;衬染

中图分类号:R379 文献标识码:A 文章编号:1001-5817(2023)03-0495-04

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2023.03.024

Optimization of the periodic acid-silver metharamine staining for fungi

Lin Qian, Fang Qingquan, Pan Yiqing

(Department of Pathology, The First Affiliated Hospital of
Xiamen University, Xiamen 361003, Fujian, China)

Abstract: **Objective** To explore the optimal scheme of periodic acid-silver metharamine (PASM) for fungi, seeking a staining reagent that provides excellent staining results while being environmentally friendly and simple to use. **Methods** Positive pathological tissues infected with known fungi were selected and embedded in wax blocks. A comparative test was conducted to evaluate the impact of different oxidants, various preparation methods for the PASM staining solution, and different counterstain reagents on the staining quality. **Results** Fungal-infected tissue sections were oxidized using a 2% periodate water solution. This staining process was simpler compared to the use of chromium trioxide solution, which is highly toxic and carcinogenic. Periodate was less toxic, the choice of a 2% periodate solution as the oxidant was considered more favorable. The modified formulation and reuse method of the PASM stain simplified the preparation of the staining solution compared to the traditional method, resulting in higher utilization rates and cost savings. While both 1% bright green staining solution and hematoxylin staining solution are recommended counterstains in textbooks, the bright green staining solution exhibited significantly better staining effects than hematoxylin. **Conclusion** For fungal-infected tissue sections, the optimal staining method involves using a 2% periodic acid aqueous solution as the oxidant, staining with the modified PASM stain prepared using the reuse method, and counterstaining with 1% bright green solution.

Key words: fungi; periodic acid-silver metharamine staining; oxidant; preparation method; counterstain

第一作者简介:林倩(1989-),女,本科,主管技师,研究方向:病理学技术,E-mail:510688294@qq.com

通讯作者简介:方庆全(1969-),男,本科,主任技师,研究方向:病理学技术、细胞学技术,E-mail:fqq1260@163.com

真菌又称霉菌,在自然界中分布极广,种类繁多,其中常见的致病菌有:毛霉菌、曲霉菌、新型隐球菌、放线菌和白色念珠菌等。近年来由于反复应用抗生素、激素、化疗和免疫制剂的治疗,使人体的抵抗力低下,且长期使用广谱抗菌药物,可能杀灭或抑制体内正常菌群,增加真菌感染风险^[1-3]。真菌易引起皮肤和皮下组织的慢性肉芽肿性等疾病^[4],必要时还需要外科手术治疗^[5],因此真菌的检出对临床的诊断和治疗显得尤为重要^[6]。六胺银染色是真菌检测的主要方法之一,为了制作染色效果佳且又环保耐用的染液,作者从氧化剂、六胺银液以及衬染试剂这几个方面一一进行对比试验,选出较为适用的几种六胺银染色试剂,力求达到背景清晰度高、显色适当、对比度好的染色效果。现将研究结果介绍如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集厦门大学附属第一医院病理科 2022 年 1 月至 2022 年 9 月已知真菌感染的阳性组织蜡块 60 例,每例蜡块连续切片 2 张,厚度为 4 μm ,切片制作后放置 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.2 仪器设备 LEICA 2245 切片机(徕卡显微系统有限公司),TY-7FB 型生物组织摊烤片机(湖北孝感亚光医用电子技术有限公司),H. SWX-600BS 电热恒温水箱(上海新苗医疗器械制造有限公司),立式玻璃染缸。

1.3 试剂 ①2%高碘酸溶液:高碘酸 2 g,蒸馏水 100 mL,常温密闭保存;②5%三氧化铬水溶液:三氧化铬 5 g,蒸馏水 100 mL,常温密闭保存;③2.5%草酸溶液:草酸 2.5 g,蒸馏水 100 mL,常温密闭保存;④3%六次甲基四胺水溶液:六次甲基四胺 3 g,蒸馏水 100 mL,常温密闭保存;⑤5%硝酸银水溶液:硝酸银 5 g,蒸馏水 100 mL,常温密闭保存;⑥5%四硼酸钠溶液:四硼酸钠 5 g,蒸馏水 100 mL,常温密闭保存;⑦0.5%氯化金溶液:氯化金 0.5 g,蒸馏水 100 mL,常温密闭保存;⑧2%硫代硫酸钠溶液:硫代硫酸钠 2 g,蒸馏水 100 mL,常温密闭保存;⑨ Harri 苏木素染液, Baso 试剂盒,常温密闭保存;⑩1%亮绿染液:亮绿 1 g,蒸馏水 100 mL,常温密闭保存;⑪无水乙醇,西陇科学股份有限公司生产,常温密闭保存;⑫二甲苯,西陇科学股份有限公司生产,常温密闭保存;⑬中性树胶,西陇科学股份有限公司生产,常温密闭保存。

1.4 六胺银染液的配制方法

1.4.1 六胺银传统配制法 按贺骁等^[7]介绍的方法配制,此液不可久存,需在临用前配制。

1.4.2 六胺银改良配制重复利用法 3%六次甲基四胺水溶液 18 mL,加入 5%硝酸银水溶液 2 mL,再加入 5%四硼酸钠溶液 2 mL,震荡至乳白色悬浊液变为

清亮透明,加入 22 mL 蒸馏水,混匀后保存于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱。使用时提前取出复温,并放入 60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴箱 5 min。在立式玻璃染缸中染色结束后,将混合的液体用滤纸过滤回收,用密封的容器放置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱储存,待下一次染色重复使用。该液体可重复使用 5~7 次。

1.5 六胺银染色步骤 ①石蜡切片 4 μm ,脱蜡至水洗,蒸馏水洗 1~2 min;②选用 5%三氧化铬溶液或者 2%高碘酸溶液作为氧化剂 40 min,蒸馏水洗 2 次;③2.5%草酸溶液 1 min,蒸馏水洗 1 次,以除去残留的铬酸,为漂白步骤;选择 2%高碘酸溶液氧化则不需要此步骤;④放入在 60 $^{\circ}\text{C}$ 水温箱温育的六胺银溶液中温育 40 min;⑤0.5%氯化金溶液 30 s,蒸馏水洗 2 次;⑥2%硫代硫酸钠溶液 5 min,蒸馏水洗 1 次;⑦ Harri 苏木素衬染 5 min 或者 1%亮绿染液衬染 1 min;⑧无水乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封固。

1.6 不同氧化剂的比较 取已知真菌感染的阳性病理组织蜡块 20 块,每块连续切片 2 片,随机分为 A、B 两组,按照上述六胺银染色步骤染色,不同的是 A 组选用 5%三氧化铬溶液作为氧化剂,B 组选用 2%高碘酸溶液作为氧化剂。均用六胺银改良配制重复利用法配制的六胺银液进行染色,1%亮绿染液衬染。比较 2 组染色结果的阳性强度、阳性区域与周围组织对比是否分明、背景是否清晰。

1.7 六胺银染液不同配制方法的比较 取已知真菌感染的阳性病理组织蜡块 20 块,每块连续切片 2 片,随机分为 C 组和 D 组,按照上述六胺银染色步骤染色,均使用高碘酸染液作为氧化剂,1%亮绿染液衬染,不同的是 C 组选用六胺银传统配制法配制的六胺银液染色,D 组选用六胺银改良配制重复利用法配制的六胺银液进行染色。比较两组染色结果的阳性强度、阳性区域与周围组织对比是否分明、背景是否清晰。

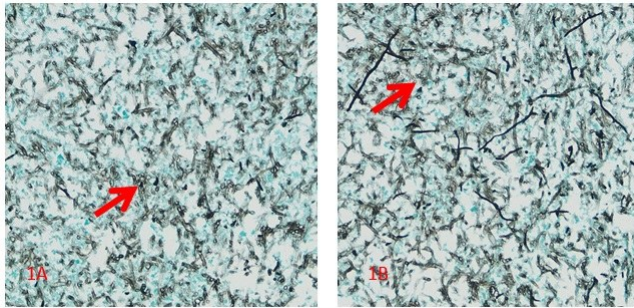
1.8 不同衬染试剂的比较 取已知真菌感染的阳性病理组织蜡块 20 块,每块连续切片 2 片,随机分为 E、F 两组,按照上述六胺银染色步骤染色,均使用高碘酸作为氧化剂,六胺银改良配制重复利用法配制的六胺银液进行染色,不同的是 E 组选用 Harri 苏木素衬染 5 min,F 组选用 1%亮绿染液衬染 1 min。比较 2 组染色结果的阳性强度、阳性区域与周围组织对比是否分明、背景是否清晰。

1.9 观察指标及评价标准 切片由 2 名资深病理医师进行双盲评分,评分采用 10 分制。10 分为满分,10 分标准为:染色背景清晰;真菌呈现黑褐色;菌丝密集处着色清晰、不过度染色;可以观察到菌丝体成空心透明的条状;真菌与衬染背景颜色分明。若 5 项指标有不同程度缺陷,根据缺陷严重程度酌情扣分。切片评分结果采用 $(\bar{x} \pm s)$ 表示。

1.10 统计学方法 采用 SPSS 20.0 软件进行分析, 计量资料采用独立样本 t 检验进行比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 以 2% 高碘酸溶液为氧化剂染色结果优于 5% 三氧化铬溶液 2% 高碘酸作为氧化剂的六胺银染色得分为 (9.35 ± 0.15) 分, 与 5% 三氧化铬溶液作为氧化剂的六胺银 (9.30 ± 0.16) 分, 差异无统计学意义 ($t = 0.225, P = 0.823$)。A 组与 B 组均染色背景清晰, 真菌呈现黑褐色, 菌丝密集处着色清晰、不过度染色, 可以观察到菌丝体成空心透明的条状, 真菌与衬染背景颜色分明 (见图 1A、图 1B)。但 B 组步骤较 A 组简便, 少了氧化后的漂白步骤, 且三氧化铬为高毒致癌物, 容易造成水体污染, 危害环境, 故选择 2% 高碘酸溶液作为氧化剂更优。



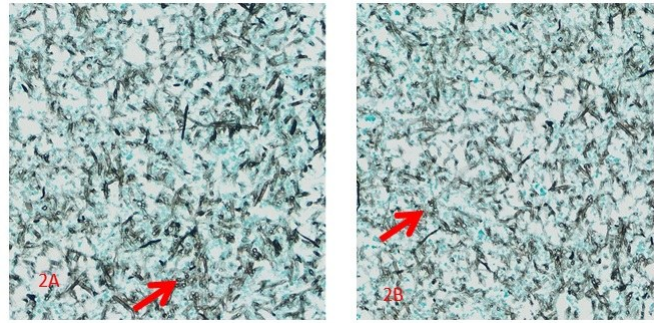
注: 1A. 2% 高碘酸溶液; 1B. 5% 三氧化铬溶液; 箭头指示: 真菌呈现黑褐色, 菌丝体成空心透明条状 ($\times 400$ 倍)。

图 1 不同氧化剂染色结果比较

2.2 六胺银改良配制重复利用法染色效果优于传统配制染色法 六胺银改良配制重复利用法染色 (9.25 ± 0.18) 分, 与传统配制染色法 (9.20 ± 0.17) 分, 差异无统计学意义 ($t = 0.204, P = 0.840$)。C 组与 D 组均染色背景清晰, 真菌呈现黑褐色, 菌丝密集处着色清晰、不过度染色, 可以观察到菌丝体成空心透明的条状, 真菌与衬染背景颜色分明 (见图 2A、图 2B)。但 D 组较 C 组染液配制简便, 对染液的利用率高, 可以重复回收使用液 5~7 次, 较 C 组节约成本。

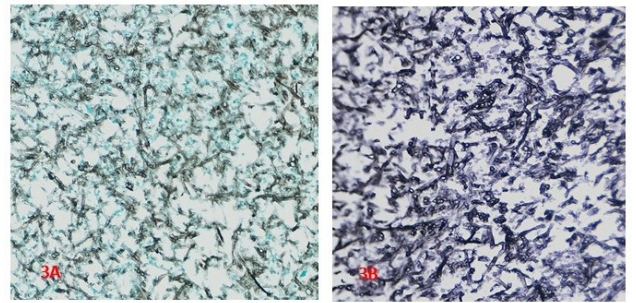
2.3 1% 亮绿染液衬染优于 Harri 苏木素染液 1% 亮绿染液衬染的六胺银染色 (9.40 ± 0.15) 分, 显著高于 Harri 苏木素染液衬染的六胺银染色 (7.75 ± 0.19) 分, $t = 6.773, P < 0.001$ 。F 组染色背景清晰, 真菌呈现黑褐色, 菌丝密集处着色清晰、不过度染色, 可以观察到菌丝体成空心透明的条状, 真菌与衬染背景颜色分明 (见图 3A)。E 组染色背景欠清晰, 真菌呈现黑褐色, 菌丝密集处着色较清晰、但染色不均匀, 可以观察到菌丝体成空心透明的条状, 真菌与衬染背景颜色

对比度差 (见图 3B)。且亮绿染液较 Harri 苏木素染液作用时间短, 故选择 1% 亮绿染色衬染优于 Harri 苏木素染液。



注: 2A. 六胺银改良配置法; 2B. 六胺银传统配置法; 箭头指示: 真菌呈现黑褐色, 菌丝体成空心透明条状 ($\times 400$ 倍)。

图 2 不同六胺银染液配置方法比较



注: 3A. 1% 亮绿染液衬染; 3B. 苏木素染液衬染; 箭头指示: 真菌呈现黑褐色, 菌丝体成空心透明条状 ($\times 400$ 倍)。

图 3 不同衬染试剂染色效果比较

3 讨论

组织病理学被认为是诊断真菌病最敏感的方法^[8], 常用的方法有荧光染色和特殊染色, 但荧光染色具有一定的局限性^[9]。六胺银染色因具有敏感性高、显示真菌形态清晰度好等优点, 成为极为常用的真菌检测方法^[10]。真菌的基本结构成分是含有较多的黏多糖和蛋白质, 这些物质经过适量的氧化剂和通过一定的氧化时间, 就能促使糖类结构分子的乙二醇或氨基的碳键断开, 生成醛类化合物, 然后暴露的游离醛基与六胺银试剂进行结合^[11], 再选用对应的衬染剂来增强组织结构成分的对比度。

六胺银染色可使各种霉菌的菌丝和/或孢子呈现明显的黑褐色, 颜色清晰, 若基于适宜的衬染背景, 显微镜下霉菌的形态极易辨认^[7]。在染色过程中, 主要分为氧化步骤、主染步骤及衬染步骤三部分。

在氧化环节, 六胺银染色较常用的氧化剂是 5% 三氧化铬溶液, 然而三氧化铬粉末为高毒致癌物, 危险性极大, 操作者在配制过程中若不慎吸入, 可引起急性呼吸道刺激症状, 严重者甚至发生化学性肺炎; 若不慎

进入消化道,则易引起呕吐、腹痛甚至血便等一系列消化道症状,重者会导致呼吸困难、急性肾功能衰竭、甚至中毒性休克等。在染色过程,如果经常接触三氧化铬,易引发鼻炎、皮炎、铬溃疡等各种接触性疾病。而且,三氧化铬是一种助燃物,使用过程易发生安全事件,而且使用后的化学废弃物容易污染环境,危害人体与各种生物^[12]。2%高碘酸溶液的安全性较三氧化铬高,王珏等^[13]认为三氧化铬氧化性较弱,可用高碘酸取代。且高碘酸为无色液体,作用时不会有色素残留,无需进行漂白,减少操作步骤,而选用 5%三氧化铬氧化后,还需要用草酸漂洗去多余的三氧化铬残留。在染色效果无显著性差异的情况下,可尝试使用 2%高碘酸作为六胺银染色中的氧化剂。

主染环节中,六胺银染液是染色过程的重要试剂,配制的方法及条件皆可直接影响染色的效果。在传统的配制方法中,需要先配制六胺银原液,保存在 4℃冰箱里,临用时再取出原液配制工作液,且使用后的液体无法保存继续使用,容易造成试剂浪费。在改良的新方法中,无需提前配制六胺银原液,在使用前将所需的液体一起配制,染色完成后收集染液过滤,用密封的容器放置于 4℃冰箱储存,待下一次染色重复使用。但需要注意的是,六胺银染液易氧化变浑浊出现黑色的氧化膜^[14],当氧化膜出现时,此染液就不能再继续使用,故该方法配制的染液可重复使用 5~7 次,之后就需弃去。改良配制法较传统配制法更节省试剂,操作简便。

衬染或称复染,一般用于特殊染色,是先将组织或细胞的某一特殊结构或其物质成分,用相应的染色方法染色之后,再用另一种染色方法进行染色,使其获得对比鲜明的染色效果。六胺银染色中,常用苏木素进行衬染,苏木素衬染后的背景成紫蓝色,与真菌的黑褐色较相近,均为暗色系,若真菌淡染而又衬染颜色过深时,镜下不易观察真菌及组织,容易混淆且对比度不明显。亮绿染液为淡绿至绿色^[15],为亮色系,作为背景色与黑褐色真菌对比分明,在镜下能轻易观察,凸显真菌。且亮绿染液的染色结果能长久保存,不易褪色。

综上所述,真菌感染组织切片使用 2%高碘酸水溶液作为氧化剂、六胺银改良配制重复利用法配制的六胺银液染色、1%亮绿染液衬染为较佳方案,具有简便、环保、节能、染色效果较佳的优点,值得推荐。

参考文献:

[1] 张黎,蒋艳秋,黄燕,等.慢性阻塞性肺疾病肺部侵袭性真

菌感染危险因素及细胞因子基因多态性[J].中华医院感染学杂志,2021,31(13):1930-1935.

- [2] WANG Z,SINGH R,MILLER B E,et al. Sputum microbiome temporal variability and dysbiosis in chronic obstructive pulmonary disease exacerbations;an analysis of the COPDMAP study[J]. Thorax,2018,73(4):331-338.
- [3] 邓懋清,陈丽萍,张晓曼.336 株临床患者脑脊液病原菌的分布及耐药性分析[J].右江民族医学院学报,2020,42(4):419-442.
- [4] BRITO A C,BITTENCOURT M J S. Chromoblastomycosis: an etiological, epidemiological, clinical, diagnostic, and treatment update [J]. An Bras Dermatol, 2018, 93(4):495-506.
- [5] YANG B,LEE H,LEE T,et al. The use of surgery in a real-world clinic to diagnose and treat pulmonary cryptococcosis in immunocompetent patients[J]. J Thorac Dis, 2019,11(4):1251-1260.
- [6] 陈学超,于永翔,王建文,等.免疫荧光技术在皮肤活检组织真菌染色中的应用[J].中国麻风皮肤病杂志,2022,38(2):101-103.
- [7] 贺骁,姬东泽,张炜明,等.高碘酸作为氧化剂在六胺银染色中的应用 [J].实用医技杂志,2020,27(3):373-374.
- [8] SPILIOPOULOU A,BARTZAVALI C,JELASTOPLU E,et al. Evaluation of a commercial PCR test for the diagnosis of dermatophyte nail infections[J]. J Med Microbiol,2015,64(Pt 1):25-31.
- [9] MOURAD B,ISMAIL M,HAWWAM S,et al. Evaluation of the efficacy of fluorescent staining and Chicago sky blue staining as methods for diagnosis of dermatophytosis in hair and nails[J]. Clin Cosmet Investig Dermatol,2019,12:751-758.
- [10] 杨伟平,吴文乔,邹宗楷,等.改良 PAS 染色法在冷冻切片中的应用[J].临床与实验病理学杂志,2018,34(3):343-344.
- [11] 高国强,李博文,肖颖,等.六胺银染色在显示活检组织真菌过程中的应用体会[J].诊断病理学杂志,2022,29(9):868-869.
- [12] 丁伟,王德田.简明病理学技术[M].杭州:浙江科学技术出版社,2014:92-94.
- [13] 王珏,姚俊霞,朱礼国,等.特殊染色技术在真菌染色中的运用[J].现代检验医学杂志,2007,22(1):52.
- [14] 邢杰,吴佳君,叶敏,等.改良六胺银染色法在真菌染色中的应用[J].临床与实验病理学杂志,2020,36(2):229-230.
- [15] 黄伟洪,朱小兰.三种不同衬染方式在抗酸染色中的应用比较[J].诊断病理学杂志,2022,29(8):770-771.

收稿日期:2023-01-15;修回日期:2023-02-14