

# 两种常用真菌染色法在真菌性角膜炎应用的优缺点比较

## The Advantages and Disadvantages of GMS and PAS Staining in Fungal Keratitis

郑健樑 张文忻 林健贤 李永平 丁运刚 姚娟 张平\*

中山大学中山眼科中心, 中山大学眼科学国家重点实验室, 广州, 510060

Jianliang Zheng, Wenxin Zhang, Jianxian Lin, Yongping Li, Yungang Ding, Juan Yao, Ping Zhang  
State Key Laboratory of Ophthalmology, Zhongshan Ophthalmic Center, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510060, China

**目的:**比较高碘酸-无色品红法(PAS)与改良的六胺银染色法(GMS)在真菌性角膜炎诊断应用中的优缺点。

**方法:**回顾性分析该科室自2007年11月至2010年6月诊断为真菌性角膜溃疡的102例标本,统计分析不同染色方法的阳性率,并对染色要点进行分析总结。

**结果:**GMS对真菌性角膜炎的真菌显示率为100%,PAS则为93.14%。

**结论:**GMS对真菌性角膜炎的真菌显示效果优于PAS,且较PAS染色省时、容易操作,不易褪色,不失为真菌染色的最佳选择。但是PAS染色显示真菌的分隔结构较为清晰,可排除色素细胞等的干扰,可以作为真菌性角膜炎鉴别诊断的补充染色。*眼科学报* 2010;25:67-69。

**关键词:**真菌;角膜炎;GMS;PAS

**Purpose:** To compare the advantages and disadvantages of GMS and PAS Staining in the diagnosis of fungal keratitis.

**Methods:** Retrospectively analysed the sections of 102 cases of fungal keratitis from November 2007 to June 2010 in our department. Statically analysed the positive rate of different staining methods. And summarized technical cruxes of GMS and PAS staining.

**Results:** The positive rates of GMS staining and PAS staining for fungal keratitis were 100% and 93.14%, respectively.

**Conclusions:** GMS staining is better than PAS staining for fungal keratitis in displaying fungi. And it takes less time and is easier in operation and makes a more durable colour than PAS staining. But PAS staining is better than GMS staining in displaying fungal septa and eliminating the interference from pigment-containing cells and other cells.

*Eye Science* 2010; 25:67-69.

**Key words:** fungus; keratitis; GMS; PAS

**真**菌为感染性角膜炎最常见的致病菌之一,常规苏木素-伊红染色真菌往往着色不良,因此需

用特殊的染色方法来显色。高碘酸-无色品红法与改良的六胺银染色法均是当前最常用的真菌染色方法<sup>[1-4]</sup>。本研究拟观察上述2种染色方法在真菌性角膜炎中的应用价值,并对其优缺点进行比较。

通信作者:张平,E-mail: pingss@126.com

## 材料与方法

### 一、材料

取2007年11月至2010年6月在我科诊断为真菌性角膜溃疡的102例标本,标本均经10%甲醛溶液固定,常规脱水,石蜡包埋,4 μm厚连续切片。玻片经两位专家在显微镜下复查,对部分褪色的标本,再次进行切片和染色。

### 二、染色方法

#### 1. 高碘酸-无色品红法

染色前先把无色品红染液取出,恢复至室温。切片脱蜡、水洗。0.5%高碘酸处理8 min,再用蒸馏水洗涤2次。进入无色品红液,加盖避光作用20 min。直接用0.5%偏重亚硫酸钠溶液作用2次,每次1 min。再用Mayer苏木素浅染细胞核1 min,流水冲水10 min。脱水、透明、封片。

#### 2. 改良的六胺银染色法<sup>[3,4]</sup>

切片脱蜡、水洗。8%铬酸作用20 min,水洗,蒸馏水洗。在高身5片染色缸中的六胺银工作液中预热,置于微波炉,中低档作用1 min。如有浅黄棕色菌体出现,则将染色缸移置于50℃温箱,以后每隔20~30 s取出镜检,控制菌体着色程度至棕黑色且背景为浅黄色为宜,水洗。脱水、透明、封片。

## 结 果

改良六胺银染色法真菌菌丝与孢子呈棕色至黑褐色,背景呈浅黄色,反差较强,较易辨认(图1)。高碘酸-无色品红法真菌呈现颜色深浅不一的紫红色,背景为浅紫红色,细胞核为蓝色。因此反差较弱,有时较难辨认(图2)。102例真菌感染的角膜标本经改良的六胺银染色法染色均可见到真菌,检出率为100%;而高碘酸-无色品红法染色只有95例见到真菌,检出率为93.14%。

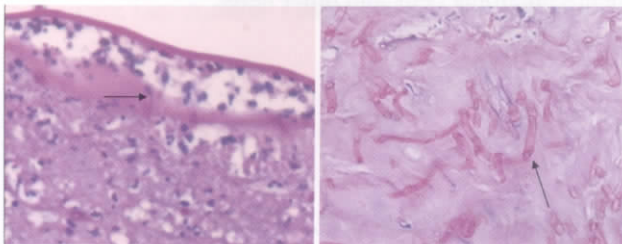


图2 高碘酸-无色品红染色法真菌呈现颜色深浅不一的紫红色,背景为浅紫红色,反差较弱

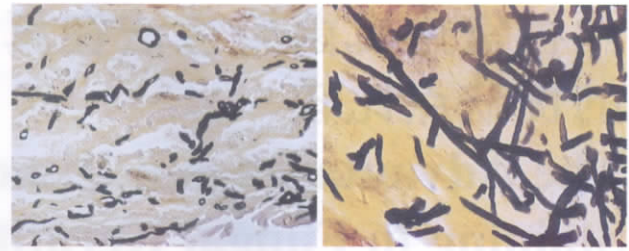


图1 改良六胺银染色法真菌菌丝呈棕色至黑褐色,背景呈浅黄色,反差较强,较易辨认

## 讨 论

真菌的染色方法很多,有苏木素-伊红、高碘酸-无色、改良的六胺银染色法、黏蛋白卡红、姬姆萨和革兰染色法等<sup>[2,5,6-7]</sup>。但目前常用的方法仍然为改良的六胺银染色法和高碘酸-无色染色法。

改良的六胺银染色法的主要染液为六胺银液,其染色原理是先用铬酸来氧化真菌的碳键而暴露出醛基,然后醛基与银化合物反应,最后经还原剂作用,使真菌呈棕色至黑褐色,而背景呈浅黄色,反差较强,较易辨认,这是其优点。但是在虹膜前粘连至角膜时,一些色素细胞进入角膜也表现为深棕色,从而易与真菌片段相混淆,而且有些炎症细胞及纤维也可以着色。另外本方法因为真菌被镀上黑褐色,颜色比较深,所以会导致真菌的一些分隔看不太清楚。

高碘酸-无色品红法的主要染液为无色品红液(雪夫液),其染色原理为高碘酸把真菌菌壁的多糖类,以乙二醇基形式存在的双碳键断开,进而转变为双醛,然后由暴露的醛基与无色品红结合呈紫红色反应。但由于真菌菌种的不同,某些真菌显色较浅。而高碘酸无色品红染色除可显示真菌外,尚可显示角膜上皮细胞的基底膜、血管内皮基底膜、角膜后弹力层、部分炎症细胞,角膜板层纤维也可以呈现浅紫红色,因此有时较难辨认。这是其对真菌检出率偏低的原因。但是PAS染色显示真菌的分隔结构较为清晰,这是其优点。

总之,六胺银染色法对真菌更为敏感、稳定、可靠,并且省时、容易操作,不易褪色,不失为真菌染色的最佳选择。但是最好两种染色同时做,可以互相参考以提高诊断的正确率及对真菌的检出率。

此外,一些染色过程操作细节值得注意。高碘酸-无色品红法:①无色品红染液要置于冰箱保

存,使用前取出恢复至室温;②用过碘酸作为氧化剂时,时间要控制在 10 min 以内,溶液溶液的 PH 值应在 3.0~5.0 之间;③用高碘酸-无色品红法染真菌,一般不会过染,但是在染色过程中要注意避光;④雪夫液可反复使用多次,一旦染液出现浅红色,则为失效;⑤偏重亚硫酸钠质量要纯,必须有较浓的刺激气味,否则会影响染色的效果。改良的六胺银染色法:①在选用六胺银染色法的过程中,当切片经微波炉处理后,若嫌反应不足置于温箱时,其温度不能太高,否之会出现反应太快,切片容易变黑,导致染色失败;②六胺银工作液用后置 4℃冰箱保存,可重复使用,当染色缸壁出现银镜现象或六胺银工作液变灰黑色时,即是该染液已经失效;③用该法染色的玻片标本,如果保存得好,数 10 年后都不会褪色,如果时间控制得当,效果更佳。

#### 参考文献

1. Mohan H, Bal A, Aulakh R. Evaluation of skin biopsies

for fungal infections: role of routine fungal staining[J]. J Cutan Pathol, 2008, 35(12): 1097-1099.

2. 张勇,朴颖实,何春燕,等.真菌性鼻窦炎 5 种真菌染色方法的比较 [J]. 诊断病理学杂志,2008,15:475-478.
3. 李永奇,李源.改良 Gomori 六胺银染色法诊断慢性侵袭性真菌性鼻及鼻窦炎[J]. 中国耳鼻咽喉头颈外科, 2007,(14):317-318.
4. 凌启波,梁英杰.常见真菌的形态学特征和常用染色方法[J]. 临床与实验病理学杂志, 2003,19(5):554-556.
5. 杨广英,姜黄,郭艳萍,等.真菌性角膜溃疡 29 例临床病理分析[J]. 眼科新进展,2008,28(8):610-611.
6. 李原,杨大章,潘琳,等.免疫组织化学法在鼻窦真菌球诊断中的价值[J]. 中华耳鼻咽喉科杂志,2004,39: 546-548.
7. 蒋文晖,王文梅,黄晓峰.原位杂交、免疫组化及 Ag-NOR 染色法在口腔念珠菌性白斑诊断中的应用 [J]. 临床口腔医学杂志,2005,21(12):752-755.

(收稿日期:2010-10-12;编辑:林燕薇)

## 中国科技核心期刊

### 《中华临床医师杂志(电子版)》2011 年度征稿征订

《中华临床医师杂志(电子版)》由国家卫生部主管,中华医学会主办,是中国科技论文统计源期刊,中国科技核心期刊。半月刊,全年出刊 24 期,定价 672 元,国内刊号 CN 11-9147/R,邮发代号 80-728,以电子版、纸版导读同时面向全国公开出版发行,被万方数据库、中国期刊网、维普数据库、美国化学文摘、乌利希期刊指南、波兰哥白尼索引等国内外知名数据库收录。

本刊 2011 年上半年刊出重点栏目分别为:耳鼻咽喉、口腔颌面部肿瘤;泌尿生殖系肿瘤;儿童心脑血管病;乳腺肿瘤;脊柱及关节疾病;内镜在消化系统疾病中的应用;呼吸系统肿瘤;内分泌及代谢疾病;肠内及肠外营养;高血压及并发症;肝胆肿瘤;危重症的处理;等。

欢迎广大临床医师积极投稿并订阅杂志! 欢迎各位专家组织、推荐、撰写重点栏目论文!

投稿信箱:北京市 100035-50 信箱 编辑部 收 邮编 100035

投稿电子邮箱:Ledocor@163.com

电话:010-62219211

传真:010-62222508

网址:www.clinicmed.net