

PAS 染色显示真菌在临床上的应用

曾秋林, 陈灵敏, 闵志刚 (江西省南昌市洪都中医院 330008)

【关键词】 PAS 染色; 真菌感染; 方法步骤

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2010.21.077

中图分类号: R446.1

文献标志码: B

文章编号: 1672-9455(2010)22-2425-01

临床上真菌感染的患者越来越多,特别是妇科及皮肤科多见,一般检测方法是细菌培养和药敏试验,真菌感染和当前滥用抗生素和激素类药物有关^[1]。在外科病房中真菌感染率不断上升,真菌已成为医院感染的常见病原菌之一,据我国医院感染监测网分析,医院真菌感染率由 1993~1996 年的 13.9% 上升至 1998~1999 年的 17.1%,1999~2000 年 24.4%,No-la-Slas 报道,每 1 万例次入院患者中共发生 1.5~8.5 例真菌血症,死亡率为 38%~80%,侵袭性真菌感染发病率位居感染性疾病第 4 位,死亡率通常为 20~30%。2005 年有报道高达 44%,近年来侵袭性真菌感染发生率呈逐年上升趋势,可见真菌感染已到了不可忽视的地步,正确诊断和检测真菌感染十分重要^[2]。要做出确切的诊断,进行具体的分析,除细菌培养和药敏试验外,一般的染色方法难以达到目的,所以必须选择特殊染色方法。近来 PAS 染色对真菌的染色越来越被广泛应用,它不仅对糖原糖蛋白物质有特异性,而且对真菌的显示亦较为理想。以下就 PAS 染色显示真菌的经验体会报道如下。

1 方法步骤

- 1.1 一般活检病理切片,或将病变分泌物涂片于玻片上自然晾干,然后固定于 10% 甲醛中 10~20 min,蒸馏水水洗。
- 1.2 1% 过碘酸染 5 min,蒸馏水水洗。
- 1.3 Schiffes(雪夫)液染 15 min。
- 1.4 偏重亚硫酸钠溶液 I、II 各 2 min。
- 1.5 自来水冲洗 10 min。
- 1.6 明矾苏木素溶液 5 min。
- 1.7 1% 盐酸乙醇分化。
- 1.8 水洗蓝化。
- 1.9 脱水,透明,盖片封固。
- 1.10 结果 真菌呈红色或紫红色,胞核蓝色。

2 试剂配方

- 2.1 Schiffes 液 将 1 g 盐基性复红放入 200 mL 的将沸蒸馏水中加热煮沸,搅拌 3~5 min,使其充分溶解,液体冷却到 50℃ 时,过滤,加 1 N 的盐酸 20 mL,冷却到 25℃,加 2 g 偏重亚硫酸钠,振荡 3 min,放置暗处 18 h(液体微黄色),加入 1~2 g 活性炭,振荡 1~2 min,然后过滤使其清亮,放入棕色瓶中,置 4℃ 储藏箱备用,用前取出恢复至室温使用。
- 2.2 偏重亚硫酸钠液 10% 偏重亚硫酸钠 7.5 mL,1 N 盐酸 7.5 mL,蒸馏水 100 mL。
- 2.3 过碘酸溶液 过碘酸 0.5~1 g,蒸馏水 100 mL。

3 各种真菌对 PAS 反应的强弱

作者搜集了 12 种真菌,除努卡菌用 PAS 染色不易显示

(用抗酸染色菌丝呈红色),隐球菌的孢子壁呈紫红色,因其厚厚的荚膜含酸性黏多糖,PAS 显示不出来外,但用阿尔新蓝和卡红染色可显示。其余 10 种真菌:放线菌、黄色酵母菌、曲霉菌、灰毡球孢子菌、孢子丝菌、白色念珠菌、黄癣、叠瓦癣、花斑癣及股癣等对 PAS 均能显示,但阳性强弱程度不同。黄癣(++++)、叠瓦癣(+++)、花斑癣(+++)、股癣(++++) (以上菌在皮肤表浅组织内)。曲霉菌(+++)、白色念珠菌(+++)、黄色酵母菌(+++)、灰毡球孢子菌(+)、孢子丝菌(++++)、放线菌(++++)、努卡菌(-)、新生隐球菌(孢子壁)(++)、新生隐球菌(荚膜)(-) (以上菌在皮肤深层及内脏肠道黏膜,宫颈阴道黏膜,口腔黏膜处)。

4 讨论

真菌对 PAS 反应呈阳性的原理是因细胞壁中有纤维素及明角质,此两种物质富有多糖类,而淀粉酶不能使之消化,与 PAS 阳性反应的糖原不同,糖原颗粒可被淀粉酶消化掉。所以 PAS 显示真菌时,最好先用淀粉酶将糖原消化掉,因糖原颗粒类似有的真菌孢子,尤其是切片中常不可能辨认申克孢子丝菌,因其小而形态不一,孢子不易与糖原颗粒区别。

其他染色方法也可显示真菌,如革兰染色等方法^[3],但不如 PAS 对真菌特异性强,PAS 着色鲜艳,易观察,比较简单方便,是鉴别真菌非常好的方法,值得推广。

关于 PAS 显色的强弱程度,是在相同的时间和环境下多次进行操作而比较出来的强弱程度,无假阳性出现,亦无不受色的情况。配制 Schiffes 液 18 h 后,不出现微黄色,而是红色首先要考虑到偏重亚硫酸钠有问题,使其不能产生应有作用。偏重亚硫酸钠主要起漂洗作用,将多余的染料冲洗掉,但往往也会使 PAS 阳性变浅,所以一定要掌握技术要领。

过碘酸的主要作用是使含有糖类的物质氧化而产生双醛基,其醛基与 Schiffes 试剂能很好结合,于是有醛基层的位置上显示红色,为取代红色染料所致。

参考文献

- [1] 周晔. 383 例阴道真菌感染鉴定及药敏分析[J]. 检验医学与临床,2008,5(1):38-39.
- [2] 谭基明. 外科病理生理学[M]. 2 版. 北京:人民卫生出版社,2009:385-386.
- [3] 孙建文. 临床酵母样真菌耐药性监测分析[J]. 检验医学与临床,2007,4(8):697-698.