

Gomori 氏六胺银染色在病理切片上 显示霉菌和抗酸杆菌方面的应用

孔伟贞 吉重敏

(病理解剖学教研室)

(Gomori 氏六胺银染色(GMS)原为 1946 年 Gomori 氏为显示糖原及粘液而设计的一种组织染色。后经 Grocott 氏改良并推广应用到切片的霉菌染色也得到较好的效果。本文使用 GMS 法显示病理切片上的各种霉菌,并分别与其他霉菌染色作了比较。此外,我们还应用 GMS 法染抗酸杆菌并与 Wade-Fite(W-F)抗酸染色作对比观察。现将观察结果及体会整理于后,供同道参考。

材料与方 法

一、溶液配制

①六亚甲基四胺—硝酸银储备液

5%硝酸银溶液 5毫升

3%六亚甲基四胺溶液 100毫升

配法:将3%六亚甲基四胺水溶液加入5%硝酸银溶液中即形成一种白色沉淀,在摇动中立即溶解。澄清液在4℃冰箱保存可使用数月。

②六亚甲基四胺—硝酸银工作液

六亚甲基四胺—硝酸银储备液10~15毫升

蒸馏水 25毫升

5%硼酸钠溶液 2毫升

③另配8%铬酸液;1%偏重亚硫酸液;0.1%氯化金溶液;2%硫代硫酸钠液;0.2%光绿醋酸水溶液(临用时用蒸馏水稀释3~5倍)。

二、染色方法(组织固定、包埋、切片与H-E法同):

①切片脱腊到水,蒸馏水洗一次。

②入8%铬酸溶液氧化20分钟。

③自来水洗数秒钟。

④入1%偏重亚硫酸钠溶液1分钟。

⑤流水冲洗5分钟。

⑥蒸馏水洗2次。

⑦入六亚甲基四胺—硝酸银工作液于温箱内(58~60℃)60~80分钟至切片呈黄褐色,霉菌、抗酸菌呈黑褐色为止(显微镜下控制)。

⑧蒸馏水洗。

⑨入0.1%氯化金溶液调色2~5分钟。

⑩蒸馏水洗。

⑪入2%硫代硫酸钠2~5分钟。

⑫自来水洗5分钟。

⑬用0.2%光绿液复染20~40秒钟或用橙黄G复染数秒钟。

⑭用95%酒精和无水酒精脱水。

⑮二甲苯透明,中性树胶封固。

我们应用GMS法染色对各种霉菌,包括浅部霉菌如足分枝菌、癣菌及深部菌病如白色念珠菌、曲菌、新型隐球菌、毛霉菌以及放线菌等都作了染色,并在对比染色上除用光绿外还选用了橙黄G和苏木素—伊红等作复染。为了对照,各片均同时作了PAS染色及Gridley醛复红染色。另外我们还用GMS染瘤型麻风切片病灶中的麻风杆菌及无反应性肺结核切片病灶中的结核杆菌,并与W-F抗酸染色作对照。

染色结果

霉菌:各种霉菌均被着色,其菌丝和芽胞呈明显的黑褐色,背景为淡绿色或橙黄色(图1~4)。

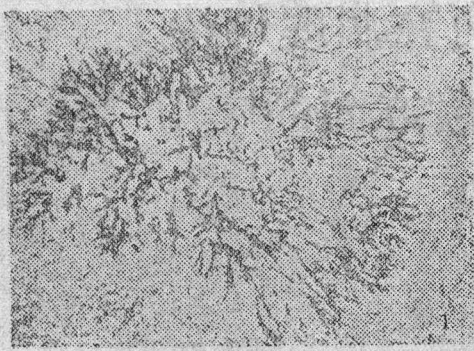


图1 示病灶内的曲菌 GMS 染色 10×10

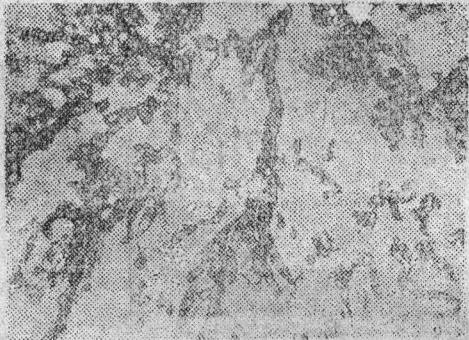


图2 高倍放大，曲菌菌缘的分隔清晰可见 GMS 染色 10×40



图3 病灶内的毛霉菌 GMS 染色 10×40

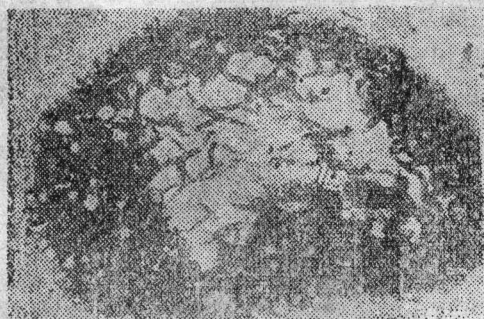


图4 病灶内的是分枝菌，菌体内的结构显示清晰 GMS 染色 10×40

抗酸杆菌：结核杆菌和麻风杆菌呈黑褐色，背景为淡绿色或橙黄色。（图5）

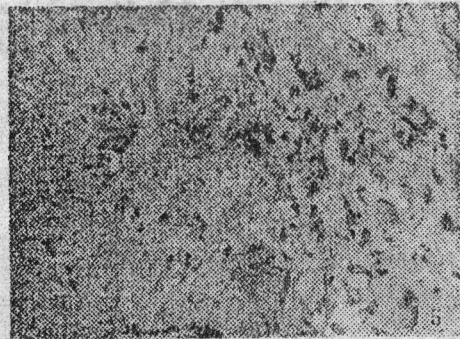


图5 瘤型麻风病灶内的麻风杆菌在图中呈黑色 GMS 染色 10×40

讨 论

近年来由于广谱抗菌素、肾上腺皮质激素和免疫抑制剂的大量应用，霉菌感染有明显增长，因此在病理切片确定霉菌感染及鉴别霉菌的种类十分必要，从而对临床诊断、治疗及死因分析都有指导意义。

病理切片在 H·E 染色对各种霉菌感染常不易察觉，特别是在霉菌感染的数量少、霉菌体积小的切片中，即使勉强辨认出来也极不清晰，或在鉴别霉菌的种类方面存在困难，往往需要用特殊染色方法才能显示。显示霉菌的方法很多，但不少实验室都习惯用过碘酸—雪夫氏反应法即 PAS 法或用 Gridley 氏法。

实践证明，应用 PAS 法显示霉菌常常不易得到满意效果。因为：①PAS 阳性反应的物质如中性粘多糖，基底膜，糖原，胶原纤维等都可能在切片中出现，因此观察结果不够清晰。②应用 PAS 法染出的霉菌与切片背景对照不够鲜明，不利于黑白照片的拍照。③PAS 法对有些霉菌如隐球菌等可以得到较满意结果，但对其它霉菌及放线菌属则不够理想。

应用 Gridley 氏法霉菌染成紫红色，背景为黄色，固然可以得到较鲜明的颜色对比，但在实践过程中我们感到 Gridley 法仍有些不足，如：所得的染色反应对比不及 GMS 法明显，若霉菌的数量少及体积小时则不易查觉，也不

利于黑白照相。而有些霉菌用此种染色结果似不够鲜明。

用 GMS 法染霉菌的作用原理基本与 Gridley 法相似, 即醛基的释放。霉菌内的粘多糖被铬酸氧化而释放出醛基, 后与六胺银作用而显示黑褐色。我们认为 GMS 法有如下优点:

①此法染色反应对比鲜明, 霉菌呈黑褐色, 背景为浅绿色或橙黄色便于查见细小而量少的霉菌, 而且黑白照相效果理想(图 1~4)。

②霉菌的细微内部结构如菌丝的分隔等都清晰可见(图 2)便于鉴别霉菌种类。

③对各种霉菌染色都敏感, 且对于死菌也有同等染色效应。

④染色结果可靠稳定, 方法相对较简便。

⑤对比染色可用各种不同的试剂, 除光绿外还可用橙黄 G 及 H·E 等复染。用 H·E 复染时对观察霉菌及其所引起的组织改变有帮助, 特别是手头上只有一张切片时, 可采用 GMSHE 而得到较满意的效果。

因此, 我们认为 GMS 法可以作为切片中显示霉菌的一种重要辅助方法, 特别可用于普查切片中所存在的霉菌。

GMS 法染色过程中体会:

①增大铬酸的浓度可缩短氧化时间, 原法用 4% 铬酸氧化 1 小时, 现用 8% 铬酸氧化 20 分钟, 可得到同样满意结果。

②切片置入六胺银工作液于温箱内加热时温度不宜超过 60℃。加热 60 分钟左右取出一次以观察有否菌体出现。如着色不够深, 可再置入温箱中加热, 并在显微镜下控制染色深浅。

③关于六亚甲基四胺—硝酸银工作液的制备:

原法是加六亚甲基四胺—硝酸银储备液 25 ml, 但经我们实践, 认为容易使底色过黑, 而我们改用 10~15 ml 则比较理想。

④关于对比染色方法:

切片不复染也很清晰(霉菌呈黑褐色, 背景为淡棕色)不复染的切片最好不经氯化金调色, 以免底色变灰。作复染的切片必须经氯化金调色, 否则不着色或着色不均匀。用光绿复

染最好浅染, 使切片反差性大, 菌体清晰明显, 柔和美观。用橙黄 G 复染也很美观鲜亮。用苏木素伊红套染后菌体也能明显地被显示。但苏木素最好用铁苏木素。

用 GMS 法染抗酸菌在文献上甚少提到。我们应用 GMS 法染瘤型麻风病灶的麻风杆菌和无反应性肺结核病灶内的结核菌, 得到较满意结果, 其阳性细菌与 W-F 抗酸染色一致。W-F 法抗酸染色, 虽不难识别抗酸菌(呈红色), 但 GMS 法抗酸菌呈黑色在浅绿色的背景上也容易查见, 特别是在细菌量少, 黑白拍照时, 用此法更为有效(图 5)。因此 GMS 法作为抗酸染色方法的一种辅助染色法是十分理想而值得推荐的。

小 结

本文应用 GMS 法于病理切片上显示各种霉菌。与 PAS 及 Gridley 等方法比较, 本方法有许多优点。表现在此法稳定可靠; 相对较简便, 对各种霉菌均敏感, 与底色对比鲜明, 适用于普查病理切片内的霉菌感染, 特别是在感染量少且霉菌体积又小时更易查见, 并且黑白照相也得到满意结果。因此我们认为 GMS 法可作为霉菌特殊染色的一种主要方法。此外应用 GMS 还可染出抗酸菌(麻风杆菌和结核杆菌), 这可作为诊断该病的一种辅助特殊染色方法。

参 考 文 献

- [1] Gomori G: A new histochemical test for glycogen and mucin. *Am J Clin Pathol* 10:177, 1946
- [2] Grocott RG: A stain for fungi in tissue sections and smears using Gomori's Methenamine-Silver Nitrate technic. *Am J Clin pathol* 25:975, 1955
- [3] Chandler F W et al: A colour atlas and textbook of the histopathology of mycotic disease. p19, Wolfe, London, 1980
- [4] Drury R A B et al: Carleton's histological technique. Oxford University press 5th ed, p 406 1980

Application of Gomori Methenamin-Silver Stain for Detecting Fungi and Acid-fast Bacilli

Kong Weizhen Ji Zhongmin

(Department of Pathology Zhongshan Medical College)

Abstract

Gomori Methenamine Silver (GMS) stain have been used in tissue sections for detecting various species of fungi. It has many advantages by comparison with PAS or Gridley's Aldehyde-fuchsin stain, such as: the reliability of the staining results, the relative simplicity of the procedure, sensitive to all species of fungi and showing better contrast for screening of fungi in sparse numbers and tiny size in tissue sections and also satisfactory for black-white photography. Therefore, GMS stain may be used as a principle special stain for fungal detection. Furthermore, GMS stain could also be used for demonstrating acid-fast bacilli (leprosy or tuberculous bacilli) and would be used as a supplementary staining technic for the diagnosis.