

改良银染色法鉴定卡氏肺孢子虫的研究

陈 锡 慰

(南京医学院寄生虫学教研室 210029)

摘要 本文采用过碘酸钠作氧化剂对卡氏肺孢子虫的包裹进行银染色,并与铬酸氧化的结果作了比较。在同一批次小鼠肺涂片,氧化时间相同时,过碘酸钠氧化可显示较多的含括号状结构的包裹,这将利于临床实验室的鉴别诊断。实验结果表明过碘酸钠作氧化剂的银染色效果优于铬酸。

关键词 卡氏肺孢子虫 卡氏肺孢子虫性肺炎 诊断 改良果氏四胺银技术

卡氏肺孢子虫 (*Pneumocystis carinii*) 是一种机会性致病寄生虫,多见于免疫不全宿主,临床引起卡氏肺孢子虫性肺炎 (*Pneumocystis carinii pneumonia*)。近年来已成为获得性免疫缺陷综合症(艾滋病)的最常见的并发症及死因^[1]。由于卡氏肺孢子虫肺炎临床缺乏特异的体征与症状,因此,它的确诊依赖于病原诊断。在诸多的病原染色方法中,作为定性诊断,以 Grocott 改良果氏四胺银技术 (Grocott's modification of Gomori's methenamine-silver nitrate technic, Grocott's method) 较受欢迎^[2]。该法可显示卡氏肺孢子虫包裹的一对特征性括号状结构 (parenthesis-like structure), 可与真菌鉴别。但 Grocott 方法,必须使用铬酸作氧化剂且结果不易稳定,因此,近年来已有采用其它氧化剂的报告。本研究选用过碘酸钠替代铬酸为氧化剂,进行该虫包裹的银染色,现报告结果如下。

1 材料与方法

1.1 卡氏肺孢子虫感染鼠肺标本的制备

选择体重约为 200g 的 Wistar 雄性大鼠与 10g 左右的昆明株小鼠,经腹部皮下注射醋酸可的松,每周二次,大鼠每次 25mg; 小鼠 2.5mg, 连续 8—9 周。为了防止细菌感染,在每升饲料饮水内加入四环素 500—1000mg。自第 8 周起,对消瘦、蓬毛并伴有呼吸困难的动物,处死后取两肺制备涂片并作姬氏染色。对查见含

有 8 个囊内小体 (intracystic body) 的卡氏肺孢子虫成熟包裹的鼠肺,选用同一小鼠的肺组织作涂片,供银染色法中不同氧化剂的作用比较。涂片经自然干燥后甲醇固定。大鼠肺组织按常规制备石蜡切片。

1.2 改良银染色法试剂的配制

所用主要试剂有: 5% 过碘酸钠, 5% 铬酸, 1% 亚硫酸氢钠, 0.1% 氯化金, 2% 硫代硫酸钠及环六亚甲基四胺硝酸银 (简称四胺银溶液) 溶液。四胺银的配制方法为: 将 5% 硝酸银 5ml 加入 3% 的四胺银溶液 100ml 内, 产生白色沉淀, 摇至透明, 即为原液。其工作液为内含原液 25ml, 5% 硼砂 2ml 及蒸馏水 25ml。上述试剂均为国产。

1.3 染色步骤

1.3.1 采用铬酸氧化

1.3.1.1 将小鼠肺涂片置于 5% 铬酸, 分别氧化 5、15 与 60min, 温度为 20℃。氧化后的标本均以流水冲洗数秒。

1.3.1.2 1% 亚硫酸氢钠 1min, 自来水冲洗后, 蒸馏水洗涤 3—4 次。

1.3.1.3 放入四胺银工作液内, 并在 60℃ 暗育约 90min, 至标本转至黄褐色为止。流水、蒸馏水各洗 5min。

1.3.1.4 0.1% 氯化金 2—5min, 蒸馏水洗 4—5 次。

1.3.1.5 2% 硫代硫酸钠 5min, 流水至少洗 10min。

1.3.1.6 亮绿复染 45 秒。

1.3.1.7 95%, 99%, 100% 乙醇逐级脱水。

1.3.1.8 二甲苯透明 3 次, 树胶封片。

1.3.2 采用过碘酸钠氧化

小鼠肺涂片置 5% 过碘酸钠内, 氧化时间分别为 5、15 与 60min, 温度为 20℃。氧化的标本经流水冲洗后, 置四胺银工作液内, 在 60℃ 孵育约 90min, 至标本转至黄褐色。余下步骤与上述铬酸氧化法相同。即省去 1% 亚硫酸氢钠的处理。

大鼠肺切片按常规方法脱蜡后, 用 100%、90%、80% 及 70% 乙醇逐级脱去二甲苯。水洗后, 置 5% 过碘酸钠氧化 5min, 略去 1% 亚硫酸氢钠处理, 余下步骤同涂片。

2 结 果

过碘酸钠或铬酸氧化的所有鼠肺涂片中, 卡氏肺孢子虫包裹呈圆形、卵圆形或不规则的多角形, 囊壁为淡褐色或深褐色, 可见 1—2 条皱褶。红细胞为淡黄色, 其余背景呈淡绿色。大鼠肺切片中的肺泡上皮细胞与肺中隔均为绿色, 与包裹对比明显容易识别。在不同氧化时间的小鼠肺涂片, 部分包裹内可见一对括号状结构, 颜色与囊壁相同(图 1, 见封 4 上, 下同)。

表 1 不同氧化剂处理肺涂片中
含括号状结构的包裹数*

氧化剂	氧化时间 (min)		
	5	15	60
过碘酸钠	43	36	6
铬酸	21	20	0

* 计数 100 个包裹(油镜下)

计数 100 个包裹中含括号状结构的包裹数有不同, 无论是过碘酸钠还是以铬酸作氧化剂, 均以较短时间 (5 或 15min) 氧化显示含括号状结构的包裹数较多。但在固定四胺银的银浸时间时, 以氧化时间长的包裹染色较深。经 60min 氧化处理, 包裹均染成黑色, 无法识别包裹内的括号状结构, 且有些包裹的囊壁呈现厚薄不一、囊内出现一些散在黑色颗粒, 提示包裹受损现

象。二种氧化剂氧化时间相同的小鼠肺涂片, 以过碘酸钠氧化显示较多含括号状结构包裹(表 1)。大鼠肺切片中也可见到含括号状结构的包裹(图 2)。上述染色的包裹内均未见到囊内小体。

3 讨 论

目前鉴定卡氏肺孢子虫的滋养体尚缺有效的染色方法, 对于卡氏肺孢子虫性肺炎的诊断大多采用包裹染色法。常用的有姬氏(Giemsa)染色、甲苯胺蓝染色(toluidine blue O stain, TBO 染色)及 Grocott 改良法。姬氏染色可显示囊内小体的胞质与核, 包裹壁不着色, 且染色背景颇深、类似于囊内小体的染色颗粒多, 因此, 识别包裹困难。TBO 染色的包裹也发现存在括号状结构^[1], 但一般多用于初筛^[4]。果氏四胺银技术首先采用铬酸使醛基游离, 再以环六亚甲基四胺硝酸银复合物通过还原使多糖类着色。最初系真菌染色法, 后经 Grocott 改良用于卡氏肺孢子虫。Grocott 改良法可使卡氏肺孢子虫包裹与真菌同样着色, 但在前者包裹内可显示一对特征性的括号状结构, 系真菌所缺, 因而成为一鉴别标志^[1]。该虫包裹的超微结构研究显示, 包裹囊壁颇厚 (100—160nm), 分为三层: 即电子致密外层、电子疏松中层与最内的浆膜层。具有一宽 1—2μm、厚 200—300nm 的向内突起, 系电子疏松中层增厚所致, 它的功能可能与囊内小体的脱囊有关。电镜观察经果氏四胺银染色的包裹, 可见该突起部沉积大量的银颗粒, 形成光镜下出现的括号状结构^[6]。上述定性特点已使该法成为卡氏肺孢子虫性肺炎病原诊断的最有效方法, 但是该法耗时(氧化 1h, 银浸 2—3h), 操作步骤多, 结果不稳定且需要相当的经验。因此, 它的临床应用受到限制。在该法, 如银浸时间不足, 包裹颜色颇淡, 不易显示; 相反包裹则染成深黑色, 很难见到括号状结构, 而且背景有时也显示黑色致使包裹难以识别。氧化过程可影响其后的银浸效果, 本研究中氧化时间较短 (5min) 时, 出现含括号状结构的包裹较多; 但氧化较长 (60min) 时,

该结构不易见到。观察同一批次鼠肺标本中包裹的括号状结构是否清晰及其出现率似可作为判断染色效果的一个参数。业已报告高锰酸钾或过碘酸可作为氧化剂用于硝酸银染色^[7],但使用于后者,由于在溶液中会产生黑色雷酸银,有爆炸的危险^[8]。从本实验结果来看,过碘酸钠作氧化剂,在省去亚硫酸氢钠处理时,仍可取得与铬酸相同的结果,且在固定银浸时间时,较之铬酸方法显示较多的含括号状结构的包裹。该法将氧化时间缩短至 5min,加上不用亚硫酸氢钠处理,较之 Grocott 改良法约节省 1h,这将有利于临床应用。此外,铬酸接触皮肤或其蒸气均对人体有害。如未妥善回收废弃铬酸,则易造成环境污染,采用过碘酸钠可避此缺

点。

致谢 本文承赵慰先教授审阅,谨致谢意。

参 考 文 献

- 1 Masur H. *J Protozool* 1989, 36(1):70—73.
- 2 Grocott R G. *Am J Clin Pathol* 1955, 25:975—979.
- 3 陈锡祺. 中国血吸虫病防治杂志, 1993, 5(1): 46—48.
- 4 Cameron R B, Watts J C, Kasten B L. *Am J Clin Pathol* 1979, 72(1): 90—93.
- 5 鹽田恒三。ニューモシスチスカリニ肺炎の診断法の開発 神原廣ニ監修 寄生虫疾患の診断法の開発と症例検討。東京醫藥ジセーナル社, 初版 1991, 65—82.
- 6 Yoshida Y. *J Protozool* 1989, 36(1): 53—60.
- 7 Senba M. *Tohoku J Exp Med* 1984, 143: 397—404.
- 8 Senba M. *Jpn J Parasitol* 1985, 34(6):95—96.

《改良银染色法鉴定卡氏肺孢子虫的研究》

一文之附图(正文见第40页)

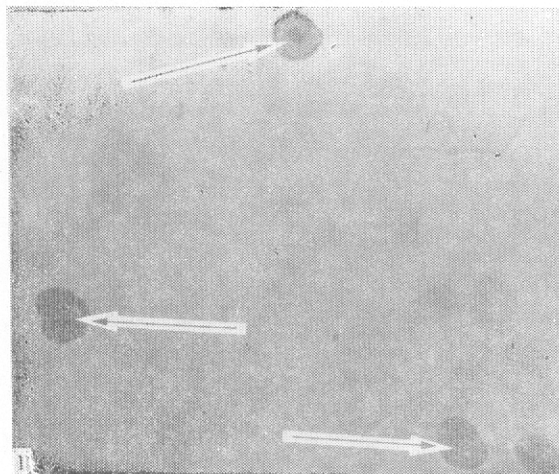


图1 小鼠肺涂片中的卡氏肺孢子虫包裹
5%过碘酸钠氧化 5min(20℃), 银浸90min。
箭头示囊内括号状结构(1000×)。



图2 大鼠肺切片中的卡氏肺孢子虫包裹
箭头示括号状结构(650×)。