

三种分色方法制作旋毛虫肌幼虫囊包染色标本的效果观察

闫钰鑫¹, 蔡欢¹, 樊航², 张澎², 杨沛文², 常远², 陈文辉², 王国英²✉

1. 河南大学 民生学院, 河南 开封 475004; 2. 河南大学 基础医学院, 河南 开封 475004

摘要: (目的) 观察三种分色方法制作旋毛虫肌幼虫囊包染色标本的效果。(方法) 分色方法 1: 染色片经体积分数为 50%、70%、80%、95% 的乙醇脱水, 然后入体积分数为 2% 的盐酸酒精中分色, 再经体积分数为 100% 的乙醇脱水。分色方法 2: 染色片入体积分数为 2% 的盐酸酒精第一次分色, 入体积分数为 50%、70%、80%、95% 的乙醇脱水, 再入体积分数为 2% 的盐酸酒精第二次分色, 然后入体积分数为 100% 的乙醇脱水。分色方法 3: 染色片入体积分数为 2% 的盐酸酒精分色, 入体积分数为 50%、70%、80%、95%、100% 的乙醇脱水。(结果) 三种分色方法制作的囊包染色标本, 囊包轮廓清晰, 囊包、囊内幼虫和周围肌纤维色泽差别较大, 结构典型, 易于观察。(结论) 制作旋毛虫肌幼虫囊包染色标本, 分色方法 1 的先脱水后分色, 分色方法 2 为脱水过程伴随两次分色, 分色方法 3 为先分色后脱水, 均可得到较好的分色效果, 关键是分色时间要掌握恰当。

关键词: 旋毛虫; 肌幼虫囊包; 染色; 分色

中图分类号: R383.1+5

文献标志码: A

DOI:10.15991/j.cnki.41-1361/r.2017.04.014

Observation on the effect of three color separation methods for preparing staining specimen of *Trichinella Spiralis* encapsulated Larvae

YAN Yuxin¹, CAI Huan¹, FAN Hang², ZHANG Peng², YANG Peiwen², CHANG Yuan², CHEN Wenhui², WANG Guoying²✉

1. Minsheng College of Henan University, Kaifeng 475004, China; 2. Medical College of Henan University, Kaifeng 475004, China

Abstract: (Objective) To observe the effect of three color separation methods for preparing staining specimen of *Trichinella Spiralis* encapsulated Larvae. (Methods) Color separation method 1: the dyeing pieces were dehydrated with 50%, 70%, 80%, 95% ethanol, then colors were separated in 2% hydrochloric acidic alcohol, and dehydrated with 100% ethanol; Color separation method 2: the dyeing pieces were conducted the first color separation in 2% hydrochloric acidic alcohol, dehydrated in 50%, 70%, 80%, 95% ethanol, the second color separation was conducted in 2% hydrochloric acidic alcohol once more, and then dehydrated in 100% ethanol; Color separation method 3: the dyeing pieces were conducted the first color separation in 2% hydrochloric acidic alcohol, dehydrated in 50%, 70%, 80%, 95%, 100% ethanol. (Results) Encapsulated Larvae dyeing samples were prepared by 3 color separation methods, the contour of the capsule was clear, there existed the color difference in the capsule, the larva of the capsule and the surrounding muscle fibers. the structure was typical and it is easy to observe. (Conclusion) In make dyeing specimens of *Trichinella Spiralis* encapsulated Larvae, the ideal color separation effect can be received with the following 3 color separation methods, that is, color separation method 1 (dehydration first and color separation second), color separation method 2 (dehydration accompanied by two times of color separation), color separation method 3 (color separation first and dehydration second). The key is to decide the appropriate color separation time.

收稿日期: 2017 - 09 - 30

基金项目: 2016 年度河南大学大学生创新创业训练计划项目 (No. 医学院 - 1B); 河南大学教学改革研究项目 (HDXJJG2015 - 132)

作者简介: 闫钰鑫 (1992 -) 男, 河南平顶山人, 本科大学生。

✉通信作者: 王国英 (1962 -) 女, 山西运城人, 高级实验师, 研究方向: 寄生虫与流行病学, E-mail: medwgy@163.com。

Key words: *Trichinella Spiralis*; encapsulated larvae; dyeing; color separation.

旋毛形线虫(*Trichinella spiralis*)简称旋毛虫,是旋毛虫病的病原体,其所引起的旋毛虫病是人兽共患寄生虫病,对人体危害大,严重感染时能致人死亡。旋毛虫幼虫寄生在宿主横纹肌细胞内,形成幼虫囊包,在活检的肌肉中查到旋毛虫幼虫囊包是确诊旋毛虫病的病原诊断依据^[1]。因此,旋毛虫肌幼虫囊包标本的制作对于旋毛虫病临床诊断和人体寄生虫学实验教学具有重要意义。

旋毛虫肌幼虫囊包标本的制作,有不染色和染色两种方法^[2-3]。通常采用染色法,常规染色一般用一种染料,为单染。在标本制作中,分色作为控制染色效果的重要步骤尤为重要。本实验用三种分色方法对旋毛虫肌幼虫囊包染色标本进行处理,取得较好的效果,报道如下。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

固定液:甲醛 6 mL,体积分数 95%乙醇 20 mL,冰醋酸 1 mL,蒸馏水 40 mL 混合均匀。染色液(醋酸明矾卡红染色液)^[4]:钾明矾(硫酸铝钾) 4 g,卡红 2 g,蒸馏水 50 mL,冰醋酸 5 mL。将明矾溶于水中煮沸,加入卡红继续煮沸 5 min,以玻棒搅拌至卡红溶解为止,冷却后置于棕色瓶中放于窗口,阳光下暴晒 2~7 d 后过滤,再加入冰醋酸。分色液:体积分数 2%的盐酸乙醇,盐酸 2 mL,无水乙醇 98 mL。

1.2 标本采集与制片

旋毛虫虫种为本实验室引自河南省疾病预防控制中心,用小白鼠传代保种的旋毛虫(*Trichinella spiralis*)。10 只昆明小鼠,体质量(18~22)g,雌性,购自郑州大学实验动物中心。每鼠感染 100 条肌幼虫,感染 300 d 后小鼠引颈处死,取完整隔肌和部分腹肌(10mm×10 mm),生理盐水清洗阳性鼠肉,放入 4℃冰箱 2 h,然后分别剪成小块,置于两张载玻片之间,挤压后两端用线扎紧,制成制片。

1.3 固定与染色

制片置于固定液中 24 h,解线后再固定 1 h,流水冲洗 5 min,蒸馏水冲洗 5 min。然后置于染色液中 24 h,取出后蒸馏水冲洗至标本不脱色为止(约 5 min)。

1.4 分色

1.4.1 分色方法 1 染色后的制片依次放入体积分数为 50%、70%、80%、95% 的乙醇中脱水,各 30 min;体积分数为 2%的盐酸酒精分色 8~13 min;

体积分数为 100%的乙醇脱水 30 min。无水乙醇:二甲苯(1:1)混合液中透明 30 min,加纯二甲苯 30 s。载玻片上滴加中性树胶,制片放入,加盖玻片,平置标本盒内,室温阴干。

1.4.2 分色方法 2 染色后的制片入体积分数为 2%的盐酸酒精分色 3 min,依次放入体积分数为 50%、70%、80%、95%的乙醇中脱水,各 30 min;体积分数为 2%的盐酸酒精再分色 6~10 min;体积分数为 100%的乙醇脱水 30 min。透明与封片步骤同分色方法 1。

1.4.3 分色方法 3 染色后的制片入体积分数为 2%的盐酸酒精分色 8~13 min,依次放入体积分数为 50%、70%、80%、95%、100%的乙醇中脱水,各 30 min。透明与封片步骤同分色方法 1。

2 结果

2.1 分色方法 1 制作的标本

图 1A 镜下观察,囊包椭圆形,囊壁薄,与周围组织能够区分;囊内分两层,内层较厚,着色较深,呈深紫红色,幼虫淡染蜷曲于内层之中,外层较内层薄,着色较浅,呈浅紫红色,囊包结构清晰。图 1B 镜下观察,囊包圆形,囊壁薄,囊的内层较厚,外层较薄,幼虫淡染蜷曲于内层。内、外层分界明显,囊包结构清晰。

2.2 分色方法 2 制作的标本

图 1C 镜下观察,囊包椭圆形,囊壁薄似一细线,呈深紫红色,与周围组织分界明显,轮廓清晰;囊内分两层,外层着色较浅,呈浅紫红色,内层着色较深,呈深紫红色,紧裹幼虫,形状呈椭圆形,幼虫淡染半透明状,蜷曲于内层之中,囊包结构清晰。图 1D 镜下观察,囊包椭圆形,囊壁薄,囊的内层较厚,形状近似圆形,幼虫淡染蜷曲于内层,外层较薄。内、外层分界明显,囊包结构清晰。

2.3 分色方法 3 制作的标本

图 1E 镜下观察,囊包近似圆形,囊壁薄呈深紫红色,与周围组织有明显分界,结构清晰。囊内分两层,外层较薄,着色较浅,呈浅紫红色;内层呈圆形,着色较深,呈深紫红色,紧裹幼虫,幼虫淡染蜷曲其中。

图 1F 镜下观察,囊包椭圆形,囊壁薄,囊的内层较厚,形状椭圆形,呈深紫红色,幼虫淡染蜷曲其中,外层着色较浅,呈浅紫红色。内、外层分界明显,囊包结构清晰。

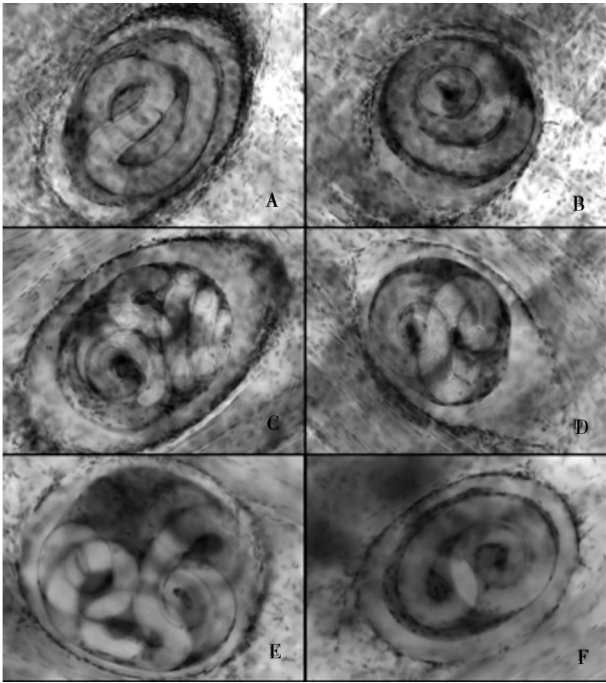


图1 旋毛虫感染300 d染色标本(400×)

A:分色方法1;B:分色方法1;C:分色方法2;

D:分色方法2;E:分色方法3;F:分色方法3

3 讨论

醋酸明矾卡红染色液染色后,旋毛虫肌幼虫囊包标本,呈暗深紫红色,囊包与周围组织着色相同,不易观察,必须经过分色,囊包、囊内幼虫及周围组织色泽显示出较大差别,囊包层次分明的典型特征才能清晰观察。本实验结果显示,三种分色方法各有特点。

分色方法1的特点:先脱水后分色。染色后的制片经体积分数为50%、70%、80%、95%的乙醇脱水,然后入分色液中分色,再经体积分数为100%的乙醇脱水。分色前,染片没有脱色现象发生,参与脱水的各不同梯度乙醇基本保持原有无色。由于分色是一次完成,要注意控制分色效果,避免分色后标本色泽过深或过浅的状况。此种分色方法制作的标本色泽稍偏暗。

分色方法2的特点:两次分色。染色后的制片入体积分数为2%的盐酸酒精第一次分色,入体积分数为50%、70%、80%、95%的乙醇脱水,再入体积分数为2%的盐酸酒精第二次分色,然后入体积分数为100%的乙醇脱水。其脱水过程伴随两次分色。第一次分色,由于时间只有3 min,这时制片色泽暗深,幼虫囊包结构不易观察;第二次分色,是控制色泽的重点阶段。分色过程中,细心观察制片的脱色情况,发现制片有染色较深的点状物,其周围的

色泽稍浅,说明分色基本完成,可将制片置于镜下,观察幼虫囊包的结构,确定分色效果。此种分色方法制作的标本色泽稍偏亮,幼虫淡染半透明状。

分色方法3的特点:先分色后脱水,是常用的分色方法^[5]。染色后的制片入体积分数为2%的盐酸酒精分色后,加入体积分数为50%、70%、80%、95%、100%的乙醇脱水。由于是先分色后脱水,且分色是一次完成,注意分色时,染片的色泽要保持稍深,因为不同梯度乙醇的脱水过程中,染片会继续轻微脱色而导致色泽逐渐变浅。特别在经体积分数50%和70%的乙醇时,可使原有的无色变为浅粉色,脱色还是较为明显的。此种分色方法制作的标本色泽稍偏鲜艳。

三种分色方法的分色时间均不固定,在一个变动的范围,因为染色时间一定的条件下,压片厚薄、取材部位均能对染色产生影响。压片薄的染片,脱色稍快,分色时间要适当缩短,压片厚的染片,脱色相对较慢,分色时间要适当延长;取材腹肌的压片脱色稍快,取材膈肌的压片脱色相对稍慢。因此,在实际操作中,分色时间要视具体情况而定。

实验结果表明,制作旋毛虫肌幼虫囊包染色标本,作为控制染色效果重要步骤的分色,既可以采用分色方法1的先脱水后分色,也可以采用分色方法2的脱水过程伴随两次分色,还可以采用分色方法3的先分色后脱水,关键是分色时间要掌握恰当,才能得到较好的分色效果。

经过三种分色方法处理的旋毛虫肌幼虫囊包染色标本,镜下观察,囊包结构均清晰可见,均可满足临床诊断和实验教学需要。

参考文献:

- [1] 詹希美. 人体寄生虫学[M]. 5版. 北京:人民卫生出版社, 2001:216-219.
- [2] 罗新萍, 王爱华. 旋毛虫肌幼虫囊包不染色标本的制作[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2003, 21(4):241.
- [3] 陈莹, 杨晓燕, 郑焕钦, 等. 三种旋毛虫肌肉期幼虫染色方法的比较研究[J]. 热带医学杂志, 2010, 10(1):9-10.
- [4] 陈佩惠, 孔德芳, 李惠珠, 等. 人体寄生虫学实验技术[M]. 北京:科学出版社, 1988. 15.
- [5] 李丹, 杨丁, 皮本伟, 等. 旋毛虫肌幼虫囊包标本的复染制作方法[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2012, 30(2):164.

[责任编辑 时红]