真菌感染缺乏特异性的病原学诊断依据时，经验性治疗仍然是一个重要且必要的治疗措施，但是我们也应该看到经验治疗存在的问题和弊端，在经验性治疗的同时尽量避免抗真菌药物过度的使用，以免重蹈抗菌药物耐药的覆辙，所以临床上要严格把握经验性治疗的指征。

参考文献

1 Iankovo AG, Vatazin AV, Astakhov PV, *et al*. The clinical course and treatment of fungal infections in the early period after kidney transplantation[J]. Urologiia, 2012,6: 26 - 28, 30 - 32

2 Kauffman CA. Fungal infections[J]. Proc Am Thorac Soc, 2006, 3(1): 35 - 40

3 Dubert M, Loi V, Tligui M, *et al*. Rapidly progressive kidney failure induced by fungal mycelia obstructing indwelling ureteral stents[J]. BMJ Case Rep, 2012, 14. pii: bcr2012007504. doi: 1. 1136/bor - 2012 - 007504

4 Hsu JL, Kuschner WG, Paik J, *et al*. The diagnostic yield of CT - guided percutaneous lung biopsy in solid organ transplant recipients[J]. Clin Transplant, 2012, 26(4): 615 - 621

5 中华内科杂志编辑委员会. 侵袭性肺部真菌感染的诊断标准与治疗原则(草案)[J]. 中华内科杂志,2006, 45(8): 697 - 700

6 董永超, 王养民, 丁小明, 等. 肾移植术后重症肺部感染两种治疗方案的比较[J]. 西北国防医学杂志,2004, 25(2): 122 - 123

7 Israel E, Hirschwerk D, Jhaveri KD. Acremonium skin and soft tissue infection in a kidney transplant recipient[J]. Transplantation, 2013, 95(4): e20

8 Wakayama M, Shibuya K, Ando T, *et al*. Deep - seated mycosis in patients with solid - organ transplantation. a study of autopsied cases in the United States[J]. Kansenshōgaku Zasshi, 2000, 74 (4): 378 - 386

9 Bodro M, Sabé N, Gomila A, *et al*. Risk factors, clinical characteristics, and outcomes of invasive fungal infections in solid organ transplant recipients[J]. Transplant Proc, 2012 44(9): 2682 - 2685

10 Einollahi B, Lessan - Pezeshki M, Aslani J, *et al*. Two decades of experience in mucormycosis after kidney transplantation[J]. Ann Transplant, 2011, 16(3): 44 - 48

11 Badiee P, Alborzi A. Invasive fungal infections in renal transplant recipients[J]. Exp Clin Transplant, 2011, 9(6): 355 - 362

12 Benedetti E, Sileri P, Pursell KJ, *et al*. Treatment of severe pneumonia in kidney transplant recipients[J]. Transplantation Proceedings, 2001, 33(7 - 8): 3652

13 许长宝, 夏熙正, 郝斌, 等. 肾移植术后不明病原体肺部感染糖皮质激素治疗体会[J]. 郑州大学学报:医学版, 2005, 40(5): 939 - 940

14 Park SJ, Song IS, Kang SW, *et al*. Pharmacokinetic effect of voriconazole on cyclosporine in the treatment of aspergillosis after renaltransplantation[J]. Clin Nephrol, 2012, 78(5): 412 - 418

15 Singh N, Huprikar S, Burdette SD, *et al*. Donor - derived fungal infections in organ transplant recipients: guidelines of the American Society ofTransplantation, infectious diseases community of practice[J]. Am J Transplant, 2012, 12(9): 2414 - 2428

（收稿日期:2013 - 05 - 08）
（修回日期:2013 - 06 - 14）

快速微波脱水法用于病理科组织标本快速检验的研究

李彦玮　王　伟　梅少帅　崔亚艳　陈　东

摘　要　目的　通过比较快速微波脱水法与传统脱水法处理的相同组织，进行19种常用抗体免疫组化染色结果的差别，初步探讨快速微波脱水法在病理实验室快速处理组织标本的应用价值。**方法**　使用全自动免疫组化染色机对经两种不同脱水方法处理的相同组织进行免疫组化染色。**结果**　19种一抗中，同种一抗的免疫组化染色结果表现出阳性定位完全一致，阳性细胞检出率的差异无统计学差异($t=0.301$, $P>0.05$)，阳性强度及背景着色基本一致。**结论**　与传统脱水法相比，快速微波脱水法处理组织标本染色质量可靠，且处理组织需时明显缩短，在用于病理科快速处理组织标本方面具有一定的意义。

关键词　微波组织处理　快速微波脱水法　传统脱水法　免疫组化

Microwave Tissue Dehydration: a Rapid Tissue - processing Method in Pathology. *Li Yanwei, Wang Wei, Mei Shaoshuai, et al. Department of Pathology, Beijing Anzhen Hospital, Capital Medical University, Beijing 100029, China*

作者单位:100029　首都医科大学附属北京安贞医院病理科
通讯作者:王伟,主管技师,电子信箱:azwangwei6323@163.com

Abstract **Objective** To compare the immunohistochemical (IHC) stain quality of the same tissues processed with rapid microwave dehydration and traditional dehydration. **Methods** An automatic immunohistochemical staining machine was used to conduct the IHC stain of the same tissues processed with two methods described above, and the staining qualities were compared carefully. **Results** The IHC signal - positive location, percentage of positive cells, grades of intensity and the staining background showed a very high concordance between the two dehydration methods. **Conclusion** Microwave tissue dehydration is a rapid and reliable tissue processing method and may potentially be useful in need of rapid pathological diagnosis.

Key words Microwave tissue dehydration; Rapid tissue - processing; Conventional tissue - processing; Immunohistochemistry

1970 年 Mayers[1] 首次把微波技术应用到组织处理领域,自此微波处理组织技术在病理科实验室逐步得到广泛使用。由于微波穿透组织标本的时间较快,使用微波快速脱水法能缩短标本的脱水处理时间,有报道称可将标本在病理科的周转时间减少到 2 ~ 6h[2,3]。病理实验室使用快速微波脱水机进行组织处理,再结合各类全自动组织染色机,比如全自动特染染色机,全自动免疫组化染色机等,可以直接缩短患者等待诊断的时间,进一步缩短患者的住院时间及降低住院费用[4]。本研究选择的 19 种一抗,在病理科广泛被用于对乳腺癌、宫颈癌、甲状腺肿物、肺癌的诊断及鉴别诊断等。笔者比较了经快速微波水法与传统脱水法处理的相同组织,进行上述 19 种常用一抗免疫组化染色,在阳性定位、阳性细胞检出率、阳性强度及背景着色的差别。初步探讨快速微波脱水法在病理实验室的应用价值。

材料与方法

1. 材料:(1)组织标本:收集笔者医院病理科 2013 年 1 ~ 6 月期间的 15 种组织类型,包括卵巢、乳腺、甲状腺、子宫、肺组织等的正常组织及相应的肿瘤病变组织标本。取材前,标本均经 10% 中性甲醛固定至少 6h。在每例标本的相同部位取材两块,厚度≤3mm。一份经快速微波脱水机进行脱水处理,另一份采用常规组织脱水程序过夜处理。常规石蜡包埋。连续石蜡切片 4μm。(2)设备及试剂:Milestone Pathos Delta 全自动快速微波脱水机,SAKURA VIP5 Tissue - Tek 组织脱水机,Leica BOND - MAX 全自动免疫组化染色机。10% 中性甲醛、无水乙醇、异丙醇等购自北京益利精细化学品有限公司;一抗购自中杉金桥生物技术有限公司;脱蜡液、清洗缓冲液、修复液 1(ER1,pH 值 6.0)、修复液 2(ER2, pH 值 9.0)、酶修复液(E1,2.5% 胰酶)、二抗及 DAB、苏木素复染系统均购自 Leica Biosystems 公司。

2. 方法:免疫组化染色,75℃ 烘烤组织切片 30min 后,在 Leica BOND - MAX 全自动免疫组化染色机上完成染色。染色程序:72℃ 快速脱蜡;无水乙醇快速冲洗;清洗缓冲液快速冲洗 ×3 次;按不同抗体的修复条件进行抗原修复;清洗缓冲液快速冲洗 ×3 次;内源性酶阻断,孵育 5min;清洗缓冲液快速冲洗 ×3 次;滴加标记一抗 150μl ,孵育 15min;清洗缓冲液快速冲洗 ×3 次;一抗后孵育,8min;清洗缓冲液冲洗 2min ×3 次;滴加二抗聚合物 150μl ,孵育 8min;清洗缓冲液冲洗,2min ×2 次;去离子水快速冲洗;滴加底物显色液 150μl ,孵育 10min;去离子水快速冲洗 ×2 次;苏木素复染,孵育 5min;去离子水快速冲洗;清洗缓冲液快速冲洗;去离子水快速冲洗,染色结束。梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。结果评分标准为:阳性强度:+:弱;++:中;+++:强。背景着色:0:无背景着色;1:有轻微背景着色,但不影响结果观察;2:有严重背景着色,影响结果观察。阳性细胞百分率:对每张切片选择 10 个高倍视野,按阳性细胞数占视野总细胞数的百分比评分。0:无着色;1:0% ~ 24%;2:25% ~ 49%;3:50% ~ 74%;4:75% ~ 100%;由两位病理医师对染色结果进行评分。评分结束后,共收集 124 张切片的评分结果,将每种一抗的不同评分结果总和再取平均值,根据组织所经的两种不同脱水方式分析结果。

3. 统计学方法:使用 SPSS 12.0 配对 t 检验法,分析经快速微波脱水法与传统脱水法处理的相同组织,其阳性细胞百分率的差异是否显著,$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 一抗阳性定位结果:19 种一抗的阳性定位包括细胞核、细胞质、细胞膜,细胞膜/质等。经快速微波脱水法(以下简称微波脱水法)与传统脱水法分别处理的相同组织中,19 种一抗的阳性定位完全一致(图 1)。

2. 阳性细胞检出率、着色强度及背景着色的检测结果:见表 1。

3. 采用配对 t 检验法:分析上述阳性细胞检出率数据,结果显示经快速微波脱水法与传统脱水法处理的相同组织,二者阳性细胞检出率的差异无统计学意义($t = 0.301$, $P > 0.05$, 图 2)。上述结果表明,分别经两种脱水方法处理的组织在免疫组化染色结果上保持高度一致。

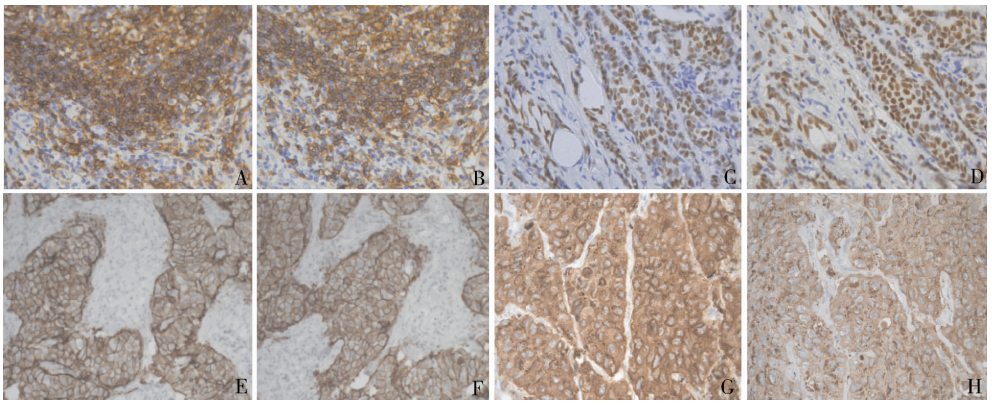

图 1　19 种一抗在分别经传统脱水法和微波脱水法处理的组织中的阳性定位（免疫组化染色，×20）

A. 经传统脱水法处理的组织，CD20 强（+）；B. 经微波脱水法处理的组织，CD20 强（+）；C. 经传统脱水法处理的组织，ER 强（+）；D. 经微波脱水法处理的组织，ER 强（+）；E. 经传统脱水法处理的组织，C－erbB－2 强（+）；F. 经微波脱水法处理的组织，C－erbB－2 强（+）；G. 传统脱水法处理的组织，NapsinA 强（+）；H. 经微波脱水法处理的组织，NapsinA 强（+）

表 1　阳性细胞检出率、着色强度及背景着色的检测结果

一抗名称	阳性细胞检出率(%)		着色强度		背景着色	
	微波	传统	微波	传统	微波	传统
ER	68.4	67.8	+++	+++	0	0
PR	66.2	65.4	+++	+++	0	0
C－erbB－2	44.3	45.8	++	++	0	0
D2－40	76.6	76.5	+	+	1	0
Desmin	79.2	78.8	+	+	1	0
VEGF－C	42.5	44.5	++	++	0	0
VEGFR－3	21.8	22.3	++	++	0	0
CD20	76.5	75.8	++	++	0	0
P53	74.9	73.3	+++	+++	0	0
Ki－67	62.2	57.5	++	++	0	0
pS2	45.8	49.2	++	++	1	1
CK19	86.8	87.2	++	++	0	0
P63	55.4	58.1	+	+	0	0
TTF－1	49.4	49.4	++	++	0	0
CK7	25.1	25.7	++	++	0	0
Napsin A	60.9	58.9	+	+	1	0
TPO	43.3	43.5	+	+	0	0
MC	69.5	68.5	++	++	1	1
CD56	56.6	54.8	+	+	0	0

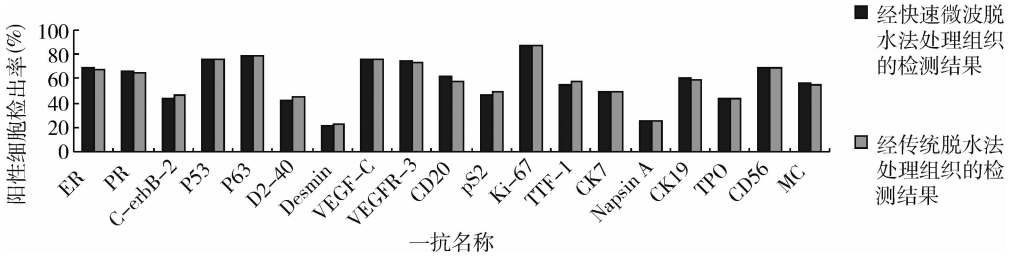

图 2　19 种一抗在经两种脱水方式处理的相同组织中阳性细胞检出率的结果

讨 论

自 1970 年以来,微波处理组织技术在病理科实验室逐步得到广泛应用,包括活检大标本的快速固定、加速组织脱钙及加速免疫组化染色[5]。由于微波穿透组织标本快,尤其对于取材厚度为 1 ~ 3mm 的组织,包括胃肠镜、支气管镜、前列腺穿刺、肾穿等小标本,使用快速微波进行组织脱水,极大地缩短了组织标本的处理时间。有报道快速微波处理可将标本在病理科的周转时间减少到 2 ~ 6h[2,3]。传统的脱水方式是组织标本经历 12h 以上的过夜处理,次日完成包埋、制片程序。使用这种脱水方法,患者至少需要 2 ~ 3 个工作日才能得到诊断结果。而使用快速微波脱水机,实验室能在 3.5h 内完成组织处理。在标本送达当日,即可完成组织脱水、制片及诊断程序。这种流程上的改善,可以直接缩短患者等待疾病诊断的时间,尤其对需要接受特殊治疗,如靶向治疗的患者,赢得了宝贵的治疗时间,同时缩短了患者的住院时间及降低了住院费用[4]。

使用快速微波脱水法处理组织,需要确定这种方法是否会对组织染色的结果造成影响。Rohr 等[4]报道了使用快速微波脱水法处理的组织,与传统脱水法处理的组织相比,二者的免疫组化染色质量相近。Lyska 等[6]报道了使用快速微波脱水法与传统脱水法处理的组织,二者 HE 切片质量相近。笔者所在科室的研究也表明快速微波脱水法与传统脱水法处理的组织,进行 HE 切片染色,二者染色结果高度一致。

目前,免疫组化是病理实验室使用十分普遍的技术方法,其染色对于疾病的诊断与鉴别诊断、临床对用药方案的选择特别重要。本研究挑选了对诊断肺腺癌具有高敏感度的肿瘤标志物 Napsin A,能够预测乳腺癌新辅助化疗方案敏感度的指标 ER、PR 及 C - erbB - 2,以及与恶性淋巴瘤的一线治疗药物美罗华的选择密切相关的 CD20[7~9]。这类一抗对于疾病的诊断与治疗方案的选择具有特殊意义,是笔者选择的着重点。笔者对比研究了经快速微波脱水法与传统脱水法处理的组织在免疫组化染色质量上的差别。结果表明,本研究选择的 19 种抗体在这两种经不同脱水方式处理的组织中,表现出来的阳性定位完全一致,二者在免疫组化阳性细胞检出率的差异无统计学意义,阳性强度及背景着色基本一致。这些结果表明经两种脱水方法处理的组织在免疫组化染色的结果上保持高度一致。快速微波脱水法既能缩短组织标本的检验时间,又不会对免疫组化染色产生质量影响。这提示了快速微波脱水法作为一种理想及可靠的组织处理技术,在病理实验室可能会有广泛的使用空间。

参考文献

1 Mayers CP. Histological fixation by microwave heating [J]. Clin Pathol, 1970,23(3):273 - 275

2 Leong AS - Y. Microwaves and turnaround times in histopathology: is this a new era in histotechnology? [J]. Am J Clin Pathol, 2004,121(4):460 - 462

3 Morales AR, Essenfeld H, Essenfeld E, *et al*. Continuous - specimen - flow, high - throughput, 1 - hour tissue processing: a system for rapid diagnostic tissue preparation[J]. Arch Pathol Lab Med, 2002, 126(5):583 - 590

4 Rohr LR, Layfield LJ, Wallin D, *et al*. A Comparison of routine and rapid microwave tissue processing in a surgical pathology laboratory: quality of histologic sections and advantages of microwave processing [J]. Am J Clin Pathol,2001,115(5):703 - 708

5 Leong AS - Y, Milios M. Accelerated immunohistochemical staining by microwaves[J]. J Pathol,1990, 161(4):327 - 334

6 Lyska L, Emerson, Sheryl R, *et al*. A Comparison of Immunohistochemical Stain quality in conventional and rapid microwave precessed tissues[J]. Am J Clin Pathol,2006,125(2):176 - 183

7 施海艳,陆锦标. 免疫标记物 Napsin A 和甲状腺转录因子 1 表达对肺腺癌的诊断价值[J]. 交通医学,2012, 26(6):530 - 532

8 陈伟财,王先明,余晓佳,等. 乳腺癌 ER,PR 和 HER - 2 的表达状况与新辅助化疗疗效的临床观察[J]. 山西医科大学学报,2010, 41(7):599 - 601

9 刘钧钧,钟敏华,彭清臻. 抗 CD20 单克隆抗体美罗华在临床治疗中的作用[J]. 中国医院药学杂志,2010,30 (16):1393 - 1396

(收稿日期:2013 - 07 - 01)
(修回日期:2013 - 07 - 20)

《医学研究杂志》编辑部启用远程稿件处理系统的启事

《医学研究杂志》编辑部已经启用远程稿件处理系统,请各位作者登陆《医学研究杂志》网站:http://www.yxyjzz.cn,注册登陆投稿系统,填写作者相关信息后进行投搞。咨询电话:010 - 52328679(单政编辑)。

《医学研究杂志》编辑部