

**病理诊断技术研究新进展研讨班
(常规技术)**

论文汇编

主办单位

中华医学会

中华病理学杂志编辑委员会

病理学分会

协办单位

青岛市立医院

徕卡仪器有限公司

山东青岛 2005 年 9 月

目次

专题讲座

病理技术对病理诊断的影响	郑 杰	1
组织标本固定、脱水的基本原则和规范操作	王德田	2
病理切片的规范化操作	丁 伟	6
关于淋巴结组织制片的探讨	唐 源 李俸媛 刘卫平	11
骨肿瘤病理技术	胡治平	12
冷冻切片常见技术质量问题分析及改进	杨京平	13
创新技术在常规制片实验室的应用	张 威	14
病理实验室的工作管理与质量保证	马恒辉 周晓军	21
北京病理技术学组开展技术交流工作介绍		
	王德田 董建强 李 泳 谢永强 王盛兰 于占洋	25
医学论文的撰写及常见问题	霍临明	32

会议交流

影响冷冻切片质量因素的分析	胥维勇 杨 群	35
免疫组织化学 SP 染色方法探讨	王群姬	37
超声波在骨组织脱钙中的应用	赵 洁 李 霞 魏志敏 孙惠安	38
病理科中易耗品的再利用	周 导	39
二级甲等医院病理实验室标准化、现代化建设的一点体会		
	李 华	41
多块微小组织旋转包埋法	李 华	42

列题交流		43
------	--	----

• 专题讲座 •

病理技术对病理诊断的影响

郑杰

北京大学医学部病理学系 100083

准确的病理诊断是临床诊断疾病、疾病预后判断和有针对性的临床治疗的基础。为分子医学时代服务的现代病理学，应具有明显的分子病理学的特点：人们越来越多地用病因学诊断代替形态学诊断；在疾病的病理诊断中广泛采用疾病分子标志物；新技术逐渐成熟并越来越多地应用于病理诊断；临床医师对病理诊断报告内容的要求趋于详实。

当前病理技术工作的内容正在发生着变化：自动化仪器广泛应用；即用型试剂不断增加；一次性刀片取代了传统的磨刀和备刀程序；病理技术工作涵盖的项目逐渐增加；病理制片的周期明显缩短。所有这些均要求病理技术工作者在掌握常规病理制片技术和特殊染色技术的同时，不断钻研病理新技术，例如免疫组化和免疫荧光技术、原位杂交技术、超微病理学技术、流式细胞术、组织芯片技术、基因表达和基因突变检测技术、肿瘤的药物敏感性检测技术等。我们的病理技术队伍已经为适应这种技术革命发生了根本性变化。在解放初期大多数病理技术人员是初中文化水平，上世纪 60—70 年代达到了中专或高中水平，目前基本达到了大专水平，并有不少病理技术人员具有了大学本科学历。在北京大学医学部病理学系的 19 名病理技术人员中具有大学本科学历者 5 人、大专学历者 9 人、中专或高中学历者 5 人。其他单位也有类似的可喜变化。便为胜任病理技术的这种革命性变化奠定了坚实的基础。

在常规病理技术方面病理技术工作者也是大有可为的，应该说常规病理切片质量是影响病理诊断最常见的因素。在影响常规病理切片质量的各个环节都应严格按病理技术规范执行。当前特别应注意的是推行中性甲醛固定、采取合适的固定时间、有效的脱水程序、正确的包埋方向、对穿刺小标本合理留取供免疫组化染色的空白切片。

衷心祝愿病理技术工作者在工作质量和工作范围上均有较快的进步。

组织标本固定、脱水的基本原则和规范操作

王德田

北京协和医院病理科 100730

4 固定是通过添加固定剂让组织中的物质如蛋白质、核酸、脂肪等凝固的过程。固定可以避免细胞中溶酶体成分的破坏作用，保持离体组织细胞与活组织时的形态相似；并防止微生物繁殖所至的腐败，以保存蛋白质与核酸的基本结构。因此，固定有渗透、杀死细胞及其微生物和固化组织的几方面作用。

组织固定是保存疾病组织器官标本用于病理诊断、科研和教学等工作所必需的过程。由于标本固定不当或不充分对后续的诊断和研究所造成的不良影响是无法弥补的，所以组织标本固定是整个组织标本处理过程中的重要环节。

一、固定的目的:

1. 保持离体组织细胞与生活时的形态相似,使细胞内特殊物质定位,保持其原有结构。如细胞内的蛋白质、酶等经固定后可沉淀或凝固。
2. 保存组织细胞内抗原、DNA 及 RNA,便于进一步的特殊检查。如特殊染色、免疫组化、细胞遗传和分子病理学检查。
3. 防止组织自溶及细菌导致的腐败。
4. 硬化组织有利于切片。固定液兼有硬化组织的作用,组织固定后可使细胞从胶体变为凝胶,增加组织硬度,易于切片。
5. 有利于染色,便于光镜下对细胞内不同成分进行区别。细胞内的不同成分沉淀凝固后折光率及对染料的亲和力将有所不同,染色后加以区别。
6. 有利于诊断的准确及相关科研的开展。

二、组织固定的注意事项:

1. 及时固定:固定的组织越新鲜越好,手术切取的组织应立即投入到固定液以便尽可能地保存组织细胞的形态结构和抗原性。
2. 及时取材:手术切除的标本应及时切开进行取材,以便保证重要的镜检部位能及时地得到固定。
3. 液量充分:一般情况下要求固定液的量应为组织体积的 6~10 倍为好。
4. 适宜固定:适宜的固定可以在保存细胞结构和抗原性之间取得必要的平衡。不同的特殊染色方法需要不同的固定液固定才能够达到满意的效果。对于较大标本而言,在及时切开固定的基础上,应尽可能在 24 h 以内取材后进入组织脱水程序。如果固定时间过长或未切开固定都会对后续工作的开展受到影响,特别是免疫组化、细胞遗传、分子生物学等工作的开展不利。

5. 适宜温度:低温可以降低固定速度,一般固定温度为室温(25℃左右)较好,温度过高可使蛋白质凝固,不易液体渗透,一般不提倡。在全自动组织脱水机上可以施加恒定的温度使得在有限的时间内可以完成固定过程,一般情况下应将固定温度控制在 35℃左右。

1. 组织过大过厚固定液不足,中心未固定(大体+HE)
2. 组织干涸再固定(大体+HE)
3. 未固定好就直接脱水(HE)
4. 未及时取材固定中心自溶(HE+大体)
5. 温度低固定液渗透差(HE)

三、固定液的选择:

接要求固定组织所需的化学试剂配成一定浓度的溶液即为固定液。组织固定是保存疾病组织器官标本(用于病理诊断、科研和教学等工作)所必须的过程。不同的组织、不同的染色方法需要不同的固定液才能产生极佳的效果,否则染色效果不满意。由于标本固定的不当或不充分对后续的工作造成不良影响、甚至难以诊断。影响标本固定的因素很多,如固定液的配制不当、固定液的选择、固定液与组织的比例、组织切取过厚过大、固定的时间、因定的温度等;特别是固定液选择不当,细胞内蛋白质、脂类、核酸等成分将会有不同程度地损失。所以标本固定是整个组织标本处理过程中的重要环节,固定液最好随配随用,并注意其浓度和酸硷度,因此根据实际工作需要,选择合适的固定液非常重要。

1. 4%中性甲醛(10%中性福尔马林)固定液:

甲醛(40%) 100ml

磷酸氢二钠 6.5g

磷酸二氢钠 4.0g

蒸馏水 900ml

PH 值 7.2~7.4

最常用的固定液，能满足常规 HE 及免疫组化、PCR 等工作，一般无特殊要求的病理标本均适用。固定效果及对组织抗原性的保存均优于一般的 4% 甲醛固定液和其他混合固定液。

2. 乙醇固定液：使用时以 80%~95% 的浓度为宜，如果用于尿酸结晶的保存糖原，用 100% 乙醇固定具有硬化、固定、脱水、分色等作用。但它对组织渗透力较弱，对保存组织中的核酸强于中性甲醛。

3. 丙酮固定液：适用于脑组织及冷冻切片的固定。

4. AF 固定液：甲醛（40%）100ml+95% 乙醇 900ml，此固定液有固定兼脱水作用，适用于皮下组织和肥大细胞的固定，固定后可直接入 90% 乙醇脱水。

5. B5 固定液：

无水醋酸钠 1.25g

升汞 6.0g 备用

浓甲醛 10 ml

蒸馏水 90 ml

多用于固定淋巴组织和脂肪组织的固定，但染色前应进行脱汞处理。

6. Bouin 固定液：

饱和苦味酸水溶液（约 1.22%）75 ml

甲醛 25 ml

冰醋酸 5 ml。

此液适用于睾丸组织的固定。固定较均匀，收缩很少，不会使组织变硬变脆。需现配现用。

常用几种固定液组织固定的效果比较：（同一时间）图示：a. 10% 中性福尔马林，b. 10% 福尔马林，c. 95% 乙醇，d. 丙酮，e. BDuin 固定液，f. AF 固定液，g. B5 固定液。

冷冻切片固定几种固定液比较（同一时间）图示：a. 丙酮固定液，b. AFA 固定液，c. 10% 中性福尔马林，d. 10% 福尔马林，e. AF 固定液。

四、组织脱水

组织经固定后会有大量水分，组织脱水是用某些溶剂逐渐将组织内的水分及组织块吸收的水分置换出来，以利于透明剂和石蜡的渗入。

脱水机日常工作程序时间表

溶液	浓度 (%)	时间设定 (h)	温度 (°C)	P/V 循环 (压力和真空交替)	混合循环
中性甲醛	10	3:00	35	+	+
乙醇	80	1:00		-	-
乙醇	95	1:00		-	-
乙醇	95	1:00		+	+
无水乙醇	100	1:00		+	+
无水乙醇	100	1:00		-	-
无水乙醇	100	1:00		+	+
无水乙醇+二甲苯	各半	0:30		+	+
二甲苯		0:40		-	-
二甲苯		0:40		+	+
石蜡		1:00	60	-	-
石蜡		1:00	60	+	+
石蜡		1:00	60	+	+
石蜡		1:00	60	+	+

截止时间：1 天 / 8: 00 am

组织脱水有手工脱水、半自动脱水机、全自动脱水机、微波炉几种方法。现大部分医院都有了半自动和全自动脱水机，现主要介绍一下全自动脱水机的程序和使用方法。

全自动密闭式脱水机有控制面板、处理槽、石蜡箱及试剂柜四个部分。

控制面板有显示屏和不键盘，可以向软件中输入 20 几个处理程序。处理时间和温度能够自行设置，也可以启动 P/V 循环（压力和真空交替）和混合循环。出现故障有提示处理故障。

双休日及节假日脱水程序及各剂的所用时间及功能相同，只将截止时间调至 2、3、7 天 8:00am 即可。

脱水机外检小组织工作程序时间表

溶液	浓度 (%)	时间设定 (h)	温度 (°C)	P/V 循环 (压力和真空交替)	混合循环
中性甲醛	10	2:00	35	+	+
乙醇	80	1:00		-	-
乙醇	95	1:00		-	-
乙醇	95	1:00		+	+
无水乙醇	100	1:00		-	-
无水乙醇	100	0:30		-	-
无水乙醇	100	0:30		+	+
无水乙醇+二甲苯	各半	0:30		+	+
二甲苯		0:20		-	-
二甲苯		0:20		+	+
石蜡		0:30	60	-	-
石蜡		0:30	60	-	-
石蜡		1:00	60	+	+
石蜡		1:00	60	+	+

截止时间：1 / 8: 00am

小动物组织工作程序时间表

溶液	浓度 (%)	时间设定 (h)	温度 (°C)	P/V 循环 (压力和真空交替)	混合循环
中性甲醛	10	2:00	35	+	+
乙醇	80	0:50		-	-
乙醇	95	0:50		-	-
乙醇	95	1:00		+	+
无水乙醇	100	0:50		-	-
无水乙醇	100	0:50		-	-
无水乙醇	100	0:50		+	+
无水乙醇+二甲苯	各半	1:00		+	+
二甲苯		0:20		-	-
二甲苯		0:20		+	+
石蜡		1:00	60	-	-
石蜡		1:00	60	+	+
石蜡		1:00	60	-	-
石蜡		1:00	60	+	+

大动物组织工作程序时间表

溶液	浓度 (%)	时间设定 (h)	温度 (°C)	P/V 循环 (压力和真空交替)	混合循环
中性甲醛	10	3:00	35	+	+
乙醇	80	0:50		-	-
乙醇	95	0:50		-	-
乙醇	95	0:50		+	+
无水乙醇	100	0:50		-	-
无水乙醇	100	0:50		-	-
无水乙醇	100	0:50		+	+
无水乙醇+二甲苯	各半	0:30		+	+
二甲苯		0:30		-	-
二甲苯		0:30		+	+
石蜡		0:50	60	-	-
石蜡		0:50	60	+	+
石蜡		0:50	60	-	-
石蜡		0:50	60	+	+

脱水机所有程序走完后，组织块浸在最后一缸石蜡内，抚按泵出钮将石蜡抽回蜡缸内，再打开脱水槽盖将组织块取出。用手纸将脱水槽盖上及周边底部的余蜡擦拭干净并将底部中央过滤器按逆时针方向拧开，用手纸将管道口石蜡擦拭干净再按顺时针方向将过滤器安装好。盖上盖后按清洗钮进行清洗，准备进行下一次工作。

脱水液体的更换规律及原则：

1. 脱水盒码放在脱水篮中不要过于紧密，否则会阻止固定剂、脱水剂的分子交换能力而使脱水能力降低，固定、脱水效果不佳。（图示）（紧、排列合格的二个对比）

2. 一般固定液每周更换一次。如组织块较多每天约为 200~300 块，固定液每 3 天更换一次。这样可以使组织在取材前固定不充分的缺陷得到纠正。固定的好坏影响切片质量，为了组织固定的彻底，可以使用脱水机的 P/V 循环（压力和真空交替）和混合循环。

3. 脱水剂梯度乙醇每星期更换一次，指脱水机装 150 个块的；如果脱水机每天工作 300 块左右的应该 3 d 更换一次乙醇液体。方法是第二缸的 80% 乙醇倒弃，以后的 95% 乙醇及无水乙醇依次前移。最后一缸的无水乙醇换为新液。如更换脱水剂将乙醇全更换为新液，就会使组织脱水过度，发干发脆。

4. 透明剂二甲苯 10 d~5 d 更换一次。二甲苯第一缸倒弃，第二缸前移换为新液。二甲苯是起媒介作用，将前液无水乙醇置换掉，石蜡才能很好地浸入组织。万不可透明时间过长或强度过大（指全部使用 P/V 循环和混合循环）而产生过透明，组织发脆发干不利于切片。

5. 石蜡要采用 56~58°C，必须干净无杂质。第一缸石蜡使用时间过长，二甲苯含量会增高，并且石蜡容易消耗，应经常观察添加石蜡。可将后几缸蜡液逐渐往前移，最后一缸补充新蜡。石蜡温度不可过高，脱水机本身有 2°C 的上浮，温度一般定为 60°C 即可。

6. 使用全自动密闭式脱水机要防止过脱水，过透明，使组织发脆发干而达不到质量高的切片。要将使用的时间，温度，P/V 循环和混合循环有机的配合好。千万不要每道脱水剂、透明剂全部 P/V 循环及混合循环。要根据组织块的多少，总共用的时间来配比。

7. 除按规定更换液体外，还要多观察液体的变化，防止液体变稠阻塞脱水机管道影响工作造成组织脱水欠佳影响染色效果和诊断结果。

半自动脱水机日常工作程序可参考全自动密闭式脱水机日常工作程序进行，但要在梯度乙醇的脱水时间加长，并注意室内温度的改变而影响脱水效果。固定剂、脱水剂、透明剂、石蜡与组织块体积比例一定要 6 倍以上。液体更换勤一些。透明剂时间不要过长，两道二甲苯不要超过 1.5 h 为宜。

手工脱水

试剂	浓度	时间 (h)
4%中性甲醛	80%	3~4
乙醇	95%	1
乙醇	95%	1
乙醇	95%	过夜
无水乙醇		1
无水乙醇		1.5
无水乙醇+二甲苯	各半	0.5
二甲苯		0.5
二甲苯		1
石蜡	62℃	1
石蜡	62℃	1
石蜡	62℃	1

注意事项：(1)所用标本缸要大一些，达到液体是组织块的 6 倍以上。(2)固定液、脱水剂要勤更换，可以采用前移更换。二甲苯时间不宜过长，不要超过 1.5 h。(3)石蜡温度不可过高。(4)脱水中适当上下摇动 2~3 次以利于固定脱水浸蜡彻底。

脱水中容易出现的问题：(图示) (1)脱水不佳：时间短、液体未及时更换，室温低。(2)无水乙醇时间过长，造成组织过硬。(3)直接高浓度脱水，造成周围组织急剧收缩，中心渗透差。(4)脱水中干涸：多发生半自动脱水机空中吊起，发生在无水后更可怕。(5)透明不佳：由于透明时间短或液体未及时更换或室温低。(6)组织过透明：放入液体时间过长，造成组织干脆。(7)二甲苯后干涸：多发生半自动脱水机空中吊起。(8)浸蜡不充分：蜡未完全溶化，浸蜡时间短。(9)浸蜡温度高：蜡太热，组织进入温度过高的石蜡后会有气泡产生。

病理切片的规范化操作

丁伟

浙江大学医学院附属第一医院 310053

病理诊断学发展到今天，出现了大量的辅助诊断手段，但最重要的还是 HE 切片。由于 HE 切片是一个传统而又经典的方法，步骤相同，所以很多人会觉得没什么好学的，其实每个人在具体操作过程中，多多少少会有一点不相同之处，正是由于这一点不相同之处，才使得切片质量各有千秋，这就是所谓的经验。随意性大，质量不稳定。病理技术有很多小窍门，有的是在牺牲制片质量的前提下发明的，使用者往往自己不清楚。各个地方的操作方法不同，习惯不同，最终导致制片质量各不相同。能做一张优质的 HE 切片并不难，难的是做好所有的切片。一个细小的环节出现问题，便会影响以后的所有步骤。

如何提高病理切片的质量和稳定性，是我们目前急需解决的问题。我认为规范化操作是病理切片的质量保证，而量化管理增加了切片质量的稳定性。所谓规范化，就是在操作过程中，对使用试剂种类、pH 值、浓度、温度、时间以及操作的手法都有详细的规定，尽可能的减少人为的影响，减少变量，减少影响制片质量的条件。所谓量化，就是把以前经验的东西通过总结，用量来衡量。比如说我们更换脱水试剂，一般都是要等组织不好切了才换，这样总有几天片子质量欠佳；也有的是几天到了就换，组织多时脱水液的水份就多，后面几天

可能组织就脱不好；组织少了脱水液倒了很浪费，我们通过几年的总结，发现组织的量和试剂的更换时间有一定的规律，用量来控制脱水的更换时间更具科学性。还有苏木精、伊红也是如此。

要想搞好制片质量，首先应该提高病理技术人员的素质，培养技术人员的敬业精神和强烈的工作责任心，这要有科室主任和病理医生的理解和支持，相互尊重，互相团结，互相配合，摆正医生与技术员的关系和位置，充分发挥技术员的积极性和主观能动性；各地应该建立质控组织，通过技术交流和行政监督的手段，促进病理技术的发展。

下面我讲的是病理切片的规范化操作：

1. 取材：取材的好坏，直接影响切片的质量。医生在取材时，首先要有一把锋利的取材刀，在切割组织时要避免取材刀来回拖拉，切取的组织块厚薄要均匀，一般厚度以 0.2 ~ 0.3 cm 为适，较容易发脆的组织如甲状腺、肝脏、血块、淋巴结、大块癌组织等可适当厚一点，而脂肪组织、肺组织、纤维性肿瘤、平滑肌瘤等致密的或试剂不易渗入的组织应取薄一些；淋巴结应修掉两侧球冠，并尽量剔除周围的脂肪组织。在取材中还应十分注意组织内是否有缝线或骨组织，如碰到不可避免的钙化组织，应与技术室讲明，在切取纤维组织、肌肉组织、胃肠道时，应注意纤维及肌肉的走向，取材时尽可能按与纤维平行走向切取为佳。

2. 固定：固定是技术室工作的第一步，也是在整个制片过程中无法补救的一步。所谓“固定”，就是组织离体后，用各种办法使其细胞内的物质尽量接近其生活状态时的形态结构和位置的过程。固定的目的是为了防止组织细胞自溶与腐败，防止细胞内的酶对蛋白质的分解作用，使细胞内的各种成分如蛋白质、脂肪、碳水化合物、酶类转变为不溶性物质，以保持原有的结构和生活时相仿。另外，组织固定后，均呈一定的硬化状态，增加了组织的韧性，而且不易变形，有利于以后的组织处理。所以组织一旦离体必需及时固定，固定液的数量应为组织的 5 倍以上。固定的关键主要与固定的及时性、固定液的选择、固定液的浓度、固定的温度和时间有关。最常用的固定液为 10% 福尔马林。由于 10% 福尔马林受到福尔马林的质量、使用时的挥发和取材时带入水分的影响，浓度容易被降低致组织固定不足，而高浓度的福尔马林，降低了对组织的穿透性，形成周围固定好而中央固定不到的现象。所以可以适当增加福尔马林的浓度，以 12% 左右为佳。pH7.0 中性福尔马林对大多数抗原有很好的保存作用，普通福尔马林略差，通过大量实验证明，二者有差异但并不十分明显，通过对抗原修复液、检测系统和修复方法的不同选择，可以减少二者的差异。由于 HE 染色时细胞核的最佳着色点 pH 为 3.5 ~ 4.5，中性福尔马林对苏木精染色有一定影响，细胞核容易发灰。而病理诊断，主要还是以 HE 切片为主，就常规 HE 规范化而言，用普通福尔马林比中性福尔马林要好（这仅为我个人观点，争议会很大，需病理同仁们进一步探讨），如果每 95 ml 12% 的福尔马林液内加入 5 ml 冰醋酸效果会更佳。当然如果根据常规切片、免疫组织化学和分子生物学的需要不同选用二种或二种以上不同的固定液分开制片是最好的解决办法。骨髓、结缔组织多的组织可用 Bouin 液固定佳，经 Bouin 液固定后的组织必须流水冲洗 4 h 以上。送检来的大器官应及时切开固定，大标本取材后（2 cm 厚）固定时间需要 6 ~ 12 h，小标本一般需要 3 ~ 6 h；当室温低 18℃ 时，应在 37℃ 以下的温箱内加温 4 ~ 6 h。

3. 水洗：固定后应该水洗（10 ~ 20 min），这一步通常被很多人所忽视，固定后不水洗，容易造成脱片和染色不鲜艳。也不利于蜡块内抗原的长期保存。

4. 脱水：所谓脱水就是利用脱水剂将组织内的水分置换出来，以利于有机溶剂的渗入，这一过程称为脱水。脱水是否彻底，直接关系到组织是否能充分透明。一般我们总认为脱水主要跟高浓度乙醇有关，而忽视了与低浓度的乙醇关系，其实 75% ~ 80% 浓度的乙醇具有极强的穿透力，在短时间内可以置换出大量的水份，而高乙醇容易使蛋白质凝固，在组织的表面形成一层硬壳，使乙醇难以渗透到组织块中间去，导致组织脱水不佳；其实高浓度乙醇里

只需脱去从低浓度到高浓度之间的水份，如果纯乙醇时间过久，或在脱水时加温过高（超过40℃），使用丙酮等等，都容易导致组织收缩过度 and 脱水过度。组织脱水引起的组织发脆有二种原因：一种是组织脱水过度，其现象是切起来组织如粉状或组织特别硬，出现一丝一丝的现象；另一种是假脆，是脱水不足引起的，切起来也是组织硬，会出现一棱一棱的现象，还会使组织整块整块往外崩，这种现象主要表现在子宫肌瘤和纤维结缔组织多的组织中；严重脱水不足的组织中间发软，甚至还会有水。

为了使组织脱水恰到好处，大小标本应该分开脱水，一般情况下，大标本脱水时间（35℃）以80%乙醇2h、95%乙醇（2道）各1.5至2h、纯乙醇（3道）各1.5至2h。小标本脱水时间应相应缩短。脱水时间长短，与室温高低有密切的相关。我们在实践中发现，室温在12~15℃时，可作为一个临界温度范围。当室温高于此温度范围时，组织容易脱水，可适当缩短脱水时间；而室温低于该温度范围时，应适当延长脱水时间。从规范化角度出发，应该尽可能的减少变量，也就是：温度、浓度和作用时间。如果一年四季都在一个恒定的温度下（35℃）最好，有条件的应该买全封闭自动脱水机。更换脱水液，应以量为基础，定量更换。根据我科经验，如试剂用量为500ml，每500个蜡块更换一次为宜。在更换脱水液时，不提倡全部试剂向前退的方法，因为此法不能保证低浓度的乙醇的浓度（往往会偏高），也不能用比重计去测量脱过水的乙醇浓度，因为脱过水的乙醇内含有大量的脂肪、蛋白质，比重计不能反映出乙醇的真正浓度。所以我们认为95%的乙醇不能退到80%的乙醇里，无水乙醇不能退到95%的乙醇里，而第二道的95%的乙醇可以退到第一道95%的乙醇里，第二道无水乙醇也可以退到第一道无水乙醇里。要保证各梯度乙醇的真正浓度。只有这样才能做好每一批组织。

5. 透明：为了使石蜡能够浸入到组织块内，必须经过一种既能与脱水剂混合，又能与石蜡相容的媒介物质，这个过程称透明。目前最好的透明剂是二甲苯。很多人认为二甲苯极易使组织发脆，这个观点有点片面，在常温下，如果不是时间过长，二甲苯并不会引起组织发脆，相反会使某些组织结构比较质韧的组织（比如子宫肌瘤等）由于透明充分而变的更好切，但是当二甲苯温度超过一定范围以后（40℃以上），极易引起组织发脆。所以二甲苯透明应该控制在室温，（2道）各30~60min为宜。

6. 浸蜡：组织透明后，在熔化的石蜡内浸渍的过程称为浸蜡。目的为了使石蜡渗透到组织中去。浸蜡温度过高（超过60℃），在蜡内加入二甲苯或由于透明时带入石蜡的二甲苯过多，都会导致组织发硬，还会使组织内的抗原受到破坏；所以浸蜡用的石蜡熔点应该在54~56℃左右（三道），时间：第一道：石蜡30min；第二道：石蜡60min；第三道：石蜡，90min以上。浸蜡温度控制在56~58℃左右。（第一道也可用硬脂酸石蜡1:3混合浸蜡，不仅可软化组织，特别适用于比较韧、硬的组织，而且由于硬脂酸是弱酸性的，染色后核浆比较鲜明，缺点是容易脱片，疏松组织在展片时容易散开，所以要用后面几道石蜡尽可能将硬脂酸洗净）。用开放式的脱水机最好每天打开第一道石蜡的盖子，让二甲苯挥发掉。浸蜡用的石蜡如有杂质应该过滤，以防吸入组织内，造成切片刀刀口受损，或切片破碎和划痕增多。

7. 包埋：用包埋剂来支持组织的过程称包埋。最常用的是石蜡包埋法。包埋的关键一是平整，二是方位。要求在包埋时，应采用镊子轻压组织块拱起部份，使之平贴于底部，通常采用组织的最大面包埋。囊壁、管腔组织应竖直包埋。小块多颗组织，应尽量放在一起，并保证在一个平面上，蜡块上下应留有余蜡。包埋时还应注意有无缝线，纸絮，如有一定要去除。胃黏膜活检标本，不能按一般的规律取最大包埋面，应采取窄面竖起包埋。包埋的蜡更应过滤，留有杂质的石蜡，容易造成污染或刀口受损。蜡的熔点应在56~58℃之间选择，不提倡在冬天使用软蜡。因为用软蜡包埋的蜡块，到了夏天，会粘在一起，不利于资料的保存，而且即使在冬天，用硬蜡包埋的蜡块也比用软蜡包埋的蜡块要好切。

8. 磨刀：要想切好一张切片，首先要有一把锋利的切片刀。磨刀是从事切片技术人员的一项最基本技术，刀磨的好坏，直接关系到切片的质量。磨刀的手法各人不同，但都要求用力均匀，使刀口和磨刀石全面接触，两手的用力点应在刀口上，而不是在刀背上。切片刀应用一次磨一次，每次仅需 10~15 min，过长时间的磨刀，容易把已经磨出的锋刃磨掉，检查切片刀是否锋利，用手试摸刀口的方法并不十分科学，不仅不能证明切片刀是否真正锋利，而且容易损害刀口，最简单的办法是每次磨好后拿一个蜡块试切一下。每次磨好刀后，应将磨刀石用盖子盖好，以防灰尘掉在磨刀石上，用有灰的磨刀石磨刀，会使切片刀产生许多细小的缺口。现在很多单位都买了磨刀机，磨刀机用来开刀锋和磨缺口的确不错，但由于磨刀的角度和时间不易精确掌握，故效果并不理想。根据我们的经验，真正的锋刃很难用机器磨出来。一次性刀片在很大程度上解决了这个问题。如用一次性刀片，必须及时更换刀口。粗切的刀口和切片用的刀口最好分开，这样可以节约刀片，也可提高切片质量。

9. 切片：切片前要把切片机上有关的螺旋拧紧，并调整好切片刀的角度。切片的第一步必需粗切。粗切的厚度大约在 15~30 μm 左右，质地较硬的组织或较小的组织应再薄一些，粗切致组织全部暴露后，才进行细切。细切至组织块表面均匀一致，无白点后，再把切出的蜡片放入温水中。切片时要求用力均匀、柔和，摇速不易过快或过慢。过快会导致切片厚薄不均，切片难以展开；过慢会使切片增厚。切片厚度一般为 3~5 μm 。切片的要求是完整、薄、均匀。切下的片膜其大小形状应与组织块一致，切片的不完整，常会将重要病变遗漏，导致误诊、漏诊。在切片放蜡块时，应注意组织包埋的方向，组织的层次，纤维、肌肉等的走向应与切片刀平行，较难切的部分应放在上面，如皮肤的表皮，肿块的包膜，胃肠道的浆膜等，这样可以减少组织的断裂现象。操作切片机时应用力均匀，避免用力过重，减少机器的磨损。在使用毛笔展片时要防止笔丝进入刀口，因为每切到一根笔丝，就会增加一个缺口。切片厚度一般为 3~5 μm ，有人认为：只要切片机刻度标着几个微米，切出来的片子就是几个微米。其实不然，当切片刀不锋利，或切片时速度不均，或切的较慢时，切的片子都会变厚，只有在切片刀十分锋利、切片匀速的情况下，才能真正保证其厚度。下面是切片时碰到的问题的原因及可能处理的方法：(1) 组织发脆：一般是脱水、透明、浸蜡时间过长、温度过高，并与组织本身质地也有关，在切片时，边切边用嘴向蜡片吹气，可能会好些。(2) 切片卷起，可能是刀不锋利，或刀锋在另一面，或刀角度过大，切片太厚等等。(3) 蜡片弯曲：可能是刀锋不均，切片刀未磨直，切片刀与蜡块不平行。(4) 透明、浸蜡时间过长、温度过高，并与组织本身质地也有关。(5) 厚薄不均：可能是刀、刀座及蜡块未夹紧，组织太硬，或切片机主轴太向前，或切片机已磨损。(6) 切片出现裂痕：可能是刀有缺口，石蜡内有杂质，组织内有钙化、骨片或有线结，也可能会有棉纸纤维等。(7) 切片不连片，切不下片，切片很厚，或者切片后蜡块发白，内陷：组织脱水不佳。补救办法：可先将蜡块溶解，取出组织，放入加热水浴的丙酮内 (80℃)，30~60 min，再进行透明浸蜡包埋切片，也许会好一点。

切片机用完后必须每天清扫干净，并用松节油或白油等把机器的表面和各关节擦拭干净。要想保证机器的精确度和延长机器的寿命，重点在于机器的保养，必须养成一个良好的工作习惯。

10. 展片与捞片：展片水温应在 42℃ 至 47℃ 之间，这主要和包埋蜡的熔点有关，水温过高，会引起组织细胞散开，水温过低，切片皱摺无法摊平。包埋蜡中如有二甲苯，会造成蜡片迅速溶解。而用一次性刀片切的片子，一碰到热水，片子上的皱摺就无法再展开，这有二个方法可以解决：第一、可以在切片时边切边向蜡片吹气，这样的片子就会非常平整，放到热水里就会自然展开，比较方便快捷，但这样的片子会略微厚一点；第二、在切完片子后，先把切片放在 30% 乙醇水溶液中，让乙醇的张力自动把皱摺展开，然后再将切片移到热水，这样的片子会较薄；如乙醇浓度过高，容易引起切片破碎，出现裂隙，像脂肪之类细胞间粘

附性较小的组织一碰到乙醇就会散开，故不能用此法。最后捞片时玻片要干净，要选择那些完整、无皱褶的切片，粘贴于玻片中 1/3 和下 1/3 的中间。

11. 烤片和脱蜡：烤片，一般在 60℃ 的温箱内烤片 0.5~1 h 左右，温度过高，会引起切片细胞收缩；时间太短（少于 20 min），容易造成脱片。脱蜡也相当重要，如果脱蜡不干净，切片不易着色或着色不匀，所以，脱蜡用的二甲苯要经常更换，一般用 3 道二甲苯，每 500 ml 液体，处理 500 张切片后更换一次为宜。当室温低于 18℃ 时，必须将切片从温箱拿出后立即放入二甲苯中脱蜡，或将二甲苯放入温箱内预热（37℃ 左右）脱蜡，最高不得超过 60℃。然后经高浓度的乙醇到低浓度的乙醇洗去二甲苯，至水。

12. 染色：染液的配制：苏木精配制非常重要：苏木精液配制的关键在于氧化。

(1) Harry's 苏木精

苏木精	1 g	无水乙醇	10 ml
硫酸铝钾	20.0 g	蒸馏水	200 ml
氧化汞	0.5 g	冰醋酸	5-8 ml

先将苏木精溶于无水乙醇中，备用。把明矾放入蒸馏水，加热溶解，再加入备用的苏木精，煮沸 2 min，先加入少量的氧化汞，防止氧化过程中苏木精外溢，玻棒搅拌，然后，边搅拌边加入氧化汞。加完后，立即（关键!!! 冬天可以多烧半分钟）移至冰水中，加速其冷却，静置一夜后，过滤。用前以 5% 的比例加入冰醋酸。如配好后时间较长，冰醋酸的量可适当多加一点。冰醋酸的量，可直接影响苏木精的着色能力和清晰度。加少了，会造成核浆共染，背景不干净；加多了，核着色能力下降。

(2) Gill 改良苏木精液（进行性染色）：

苏木精	2 g	无水乙醇	250 ml
硫酸铝	17.6 g	蒸馏水	750 ml
碘酸钠	0.2 g	冰醋酸	20 ml

先将苏木精溶于无水乙醇，硫酸铝溶于蒸馏水，然后两液混合后加入碘酸钠，最后加入冰醋酸。此液为半氧化进行性苏木精液，染色不需要分化，不会产生沉淀，氧化膜少。此方法用于机器染色较好。

(3) 伊红（醇溶性） 配方：

伊红（醇溶性）	2.5~5 g
95%乙醇	1000 ml

加冰醋酸至半透明状，冰醋酸过多，可导致染色时细胞核酸化。

苏木精染色时间要根据染料的新旧、温度、切片的类型而定，一般为 5~15 min。经水略洗后，用盐酸乙醇分化是关键，分化程度必须用显微镜控制。分化水洗后，可用温水或自来水蓝化，并充分水洗（流水冲洗 5 min 以上），以防盐酸残留导致切片褪色。我们不提倡使用碱性溶液（释氨水、肥皂水等）促蓝，尽管蓝化效果很好，但从实践的结果来看，用碱性溶液促蓝的切片不能长期保存，容易褪色。最后入伊红对比染色（5~20 s）。HE 染色的关键在于深浅适度，对比鲜明，一般有经验的，肉眼就能判断，但偶而也会出现失误，所以用显微镜控制是最保险的方法。其关键的步骤在于苏木精染好后的分化及蓝化过程，在蓝化结束后，应在显微镜下观察细胞核着色是否合适，核结构是否清晰，胞质内是否有残留的苏木精等等。染色理想的切片在显微镜下应是：细胞核与细胞质应蓝红相映，鲜艳美丽；核浆对比明显，核膜及核染色质颗粒清晰可见。

13. 脱水和封片：切片脱水应从低浓度的乙醇到高浓度的乙醇，80%乙醇 1 道，95%乙醇 2 道，纯乙醇 2 道，（正丁醇 1 道），二甲苯 2 道。浓度低的乙醇比浓度高的乙醇更容易脱水，但也容易使伊红退色，故脱水时间可短一点，每道 3~5 min，纯乙醇每道 10 min。为

增加乙醇与二甲苯的相融性,可在二甲苯前面增加一道正丁醇;石碳酸一二甲苯液也有此效,但用石碳酸时如不洗净,可引起切片退色,不利于切片久存,故不作推荐。切片经二甲苯透明后,用中性树胶封固。为增加切片的透明度,防止细胞收缩、龟裂或切片出现黑色结晶样小点。所以我们认为切片应该湿封,尽可能不用干封,严禁用温箱烤干或电风吹干后干封。在南方冬春、霉雨季节,封片时要防止口鼻呼出的气体接触到切片;在天气较潮湿的日子里,不宜一次将多张切片取出待封,以免切片“还潮”,形成透明不佳,出现云雾状水珠。脱水剂的更换也应有一定的时间规定。一般是每 500ml 液体,处理 500 张切片后更换一次为宜。封片树胶不能过稀,封片时树胶要均匀充满盖玻片且树胶不及外溢为佳。要将组织全部覆盖,也不能有气泡。为了提高质量,关心技术员的身体健康,我建议有条件的病理科应该购买自动封片机。

最后,粘贴标签,标签必须贴于玻片左侧,编号书写清楚,最好能打印。

最后我希望在中华病理学会的领导下,通过我们的努力,使中国的病理技术有一个质的飞跃。

关于淋巴结组织制片的探讨

唐源 李俸媛 刘卫平

四川大学华西医院病理科 610041

淋巴结组织具有组织结构致密、细胞丰富等组织学特点,使得在制片时较易出现组织处理不好、切片过厚、分色不足、对比不够等问题,从而增加了诊断的困难,甚至可能导致误诊。因此,做好淋巴结组织的制片是病理常规技术的一项重要工作。为此,我们总结我科组织技术室多年的工作经验和体会,以及一些实验结果来与大家共同探讨淋巴结组织的制片问题。

一、材料与方法

1. 材料:随机取一组新鲜淋巴结组织和一组冻存(-80℃)的淋巴结组织。

2. 方法:将两组淋巴结组织各自按照固定时间、处理方式、制片厚度和染色时间分成几组进行处理,步骤如下:(1)固定:各组淋巴结按要求取材,分别用 10%中性福尔马林固定 6 h、12 h 和 24 h。(2)组织处理:分别采用手工脱水(95%过夜)和全自动组织处理机两种方法。(3)包埋、制片:常规包埋,所得每个蜡块分别进行切片,厚度分别为 2 μm、3 μm、4 μm 和 5 μm。(4)染色:常规脱蜡到水,新鲜配制的 Harris 苏木精染色,染色时间分别为 3 min、6 min 和 9 min。1%盐酸乙醇分化,镜下观察分化程度,记录各自的最佳时间,伊红染色 1~2 min,常规脱水,透明,封片。

3 结果判定:光镜下观察,按《临床技术操作规范》(病理学分册)的 HE 切片质量标准进行评价。

二、结果

1. 不同固定时间
2. 不同处理方法
3. 不同切片厚度及不同的染色时间

三、讨论

淋巴结组织的制片属于常规病理制片的一部分,因此也有时间的要求。但由于淋巴结的一些组织学特点使其在制片上有一定的难度。那么在实际工作中对淋巴结组织的样本是

否需要特殊对待，又有多大的特殊性呢？综合上述实验结果，以及我们的实际工作经验，我们认为对于淋巴结的固定和组织处理按照规范的常规外检处理程序是完全可以达到相关的技术要求，并能够满足外科病理诊断的需要。从组织处理上来看，人工脱水和处理机两种方法皆可；从组织片的厚度来看，淋巴结组织的切片宜薄不宜厚，以 $2\ \mu\text{m}$ 和 $3\ \mu\text{m}$ 为佳，而且应使用无缺口的锋利刀口和安放平稳的合格切片机；从淋巴结组织切片的染色来看，虽然我们的实验结果中有两两对应的苏木精和盐酸乙醇处理时间，但在实际工作中，染液的种类和新旧程度会有所不同，时间也应随之调整，因此，可行的办法就是镜下观察上色情况，从而找到最佳染色和分色时间。从组织的保存方法来看，新鲜淋巴结组织和冻存的淋巴结组织在常规的 HE 制片中并无太大区别，但这并不能说明在其他的病理检测方法上二者效果等同。

骨肿瘤病理技术

胡治平

上海交通大学附属第六人民医院病理科 200233

1. 骨肿瘤大体标本处理：(1) 剥离肿瘤周围正常的软组织包括皮肤、皮下组织和肌肉，暴露受累骨和肿瘤组织。(2) 长骨肿瘤很少越过关节累及关节另一侧的骨组织（手足骨、中轴骨除外）。故正常关节可以解脱，如股骨下端或胫骨上端骨肿瘤的截肢标本，在解剖取材时可以作膝关节解脱。(3) 手足骨和中轴骨的肿瘤（尤其是恶性肿瘤）常常越过关节累及关节对侧骨或邻近骨，故一般不作关节解脱。(4) 大体照相。(5) 通过肿瘤最大面纵形锯开骨和肿瘤。(6) 切面照相。(7) 通过肿瘤最大面，锯一层 $3\ \text{mm}$ 厚的瘤组织，包括肿瘤和肿瘤周围正常骨组织。(8) 用流水冲洗组织并用刷子轻轻刷去骨屑。骨屑残留在骨小梁间隙内会影响诊断，甚至被缺乏经验的医师误认为死骨或浸润性生长的骨样组织。(9) 将骨片和肿瘤组织分割成边长 $1.5\ \text{cm}$ 的组织块，并编号。(10) 硬组织脱钙。

2. 脱钙液配方及脱钙时间：

脱钙液配方（高浓度）

盐酸 (HCl)	8ml
甲酸 (CH_2O_2)	15ml
蒸馏水 (H_2O)	100ml

脱钙液配方（低浓度）

盐酸 (HCl)	5ml
甲酸 (CH_2O_2)	8ml
75%乙醇	50ml
蒸馏水 (H_2O)	50ml

脱钙时间：(1) 穿刺活检骨组织：30 min；(2) 松质骨 ($<3\ \text{mm}$ 厚度) 或刮出的破碎骨组织：6~10 h；(3) 皮质骨 ($<3\ \text{mm}$ 厚度)：8~24 h。

脱钙时间与之有关的因素：(1) 与骨片厚度有关；(2) 与室温有关；(3) 与个体差异有关：老年人骨质疏松者，时间短，成年人皮质骨时间长；(4) 与肿瘤性质有关：硬化性骨髓炎、硬化性骨肉瘤、骨旁骨肉瘤、内生性骨疣——时间长，中间要换一次脱钙液。(5) 以针能触动或刀刚能切动为宜，切忌脱钙过头。

3. 脱钙后组织处理：(1) 先用流水冲洗；(2) 在 75%乙醇中浸泡 1~2 h。目的：彻底清除酸性脱钙液，以免 HE 染色偏红，碱性染料不着色，影响诊断。

4. 快速脱钙方法：(1) 超声振荡 30 min 或微波 1~3 min；(2) 提高脱钙液的酸度：

盐酸 10 ml

甲酸 20 ml

蒸馏水 100 ml

(3) 提高脱钙液的温度 40℃~60℃，时间 2~4 h。

5. 硬组织切片应用范围：(1) 不脱钙骨组织，牙齿，象牙等硬组织。(2) 血管内金属支架，带同位素的金属支架。(3) 内固定组织，包括金属、陶瓷制品和各种骨内填充物。

6. 硬组织切片方法：(1) 固定：90%乙醇→100%乙醇→100%乙醇→二甲苯。(2) 塑料包埋：由甲基丙烯酸脂、凝固剂、氧化剂合成。(3) 硬组织切片：使用莱卡公司 1600 型锯齿切片机。(4) 硬组织切片厚度一般在 30~40 μm 作 HE 染色或特殊染色如：Masson 氏或 Mallory 三色染色。

冷冻切片常见技术质量问题分析及改进

杨京平

北京大学医学部病理系 100083

手术中的快速冷冻切片要求病理医师在很短时间内，向手术医师提供病理诊断意见。与常规石蜡切片的病理诊断相比，局限性和难度更大，出现漏诊和误诊的可能性也更大。冷冻切片质量的好坏，与诊断的关系非常密切，制作一张高质量的冷冻切片，是保证诊断的基本前提。

冷冻切片的常见技术质量问题，主要有以下几种：组织挤压皱缩，组织破碎或形成空洞，组织贴附不平或有皱褶，脂肪组织不易切片，出现冰晶，细胞染色过浅或模糊不清，细胞核与细胞质染色对比不清晰，细胞的细微结构不能显示等。

我们对以上常见技术质量问题及原因进行探讨，并提出改进意见。

一、常见技术质量问题分析

1. 组织挤压、皱缩：常见于组织结构软硬不同的组织，如皮肤。解决办法：先切较软的部分，将表皮面放在标本的上端，先切较软的皮下组织，一次切真皮、表皮，同时用毛刷轻轻展开切片，才能作出完整的好片。

2. 组织破碎或形成空洞：常见于组织结构软硬不同的组织或甲状腺等有腔洞的组织。解决办法：首先组织不能冻得太硬，如果太硬，组织很脆就会破碎形成空洞，一般组织在包埋剂中冻八成时切片最佳，甲状腺组织切片 80%乙醇固定后不必水洗，直接行 HE 染色，可避免胶质流失。

3. 组织贴附不平或有皱褶：解决办法：切片切好后用载玻片贴附组织时手不能颤抖，而且在贴附组织时手有一个向下伸展的动作。

4. 脂肪组织不易切片：解决办法：如果要看肿瘤边缘是否切净，在有脂肪的情况下，首先把切片机切片厚度增加一般 8~10 μm，而且增加冷冻时间，或在粗切后细切前拿下冻头，将组织面朝下置于速冻台上行重复降温冷冻，切片后固定时间稍长些否则切片会脱落。

5. 出现冰晶：解决办法：液氮速冻后放在半凝状态包埋剂中切片，也可用异戊烷速冻后切片都可以减少冰晶。液氮速冻程序：在保温瓶中准备液氮约 200 ml，在小烧杯中准备

异戊烷约 30 ml, 将盛有异戊烷的烧杯置于液氮中, 预冷至无气雾。注意二种物质不能相混。准备一硬纸片做底托, 放少量 OCT, 置-20℃恒冷切片机内, 待底托上的 OCT 开始冻结时, 将取好的组织块放置于上, 在表面加少许 OCT。用长镊子夹住纸托, 组织向上, 迅速浸入异戊烷中, 速冻约 20~30 s, 即可取出。可以在室温中放置 1 min 左右, 使标本升温至-20℃。准备一金属底托, 预冷。将冻好的组织块贴附于底托上, 可开始切片。

6. 细胞染色过浅或模糊不清: 解决办法: 首先冷冻切片切好后放 80%乙醇固定时间稍长些, 苏木精染色时间稍长些, 逐级乙醇脱水时间长些, 避免过快流程。

7. 细胞核与细胞质染色对比不清晰, 细胞的细微结构不能显示: 解决办法: 苏木精对比染色后要用 1%盐酸乙醇分化充分, 再用伊红染胞质, 以基质清晰, 细胞核质明显为宜。分化时间要根据组织的性质, 切片的薄厚, 苏木精染色深浅来决定。

二、不同组织的处理应有区别

技术人员在接到冰冻病理时首先要知道是什么组织, 不同的组织在处理上是有区别的。

1. 软硬组织不同: 软组织如肺、乳腺、胃肠组织在用 OCT 包埋时尽可能冻硬后切片为佳, 胃肠组织切片时横向放置, 黏膜面向下浆膜面向上。硬组织如子宫, 宫颈用 OCT 包埋时不能冻得太硬, 一般冻八成状态时切片效果最佳。取材时将组织切取成方形, 切片时将组织上下对角放置, 这样组织作用于切片刀的阻力小比较容易切成平整的薄片。如果太硬可用手指贴在组织上稍加温使其软化, 可切出完整切片。

2. 细胞致密与稀疏不同: 细胞致密如肝脏、脾脏、淋巴结, 首先组织在 OCT 包埋中不能冻得太硬, 如果太硬切片时很脆而且细胞致密的组织切片厚度也应适当降为 $3\mu\text{m}$, 一般冻八成即可切片。在染色时细胞核的染色和分化非常重要, 一般根据各科苏木精, 伊红染液新旧情况而定, 我科苏木精染色 1 min, 1%盐酸乙醇分化 2 s, 1%氨水返蓝 5 s, 伊红染色 10 s 即可逐级乙醇脱水; 二甲苯透明封片即可。细胞稀疏如脂肪切不成片, 应该增加冷冻时间, 亦可在冷冻前用吸水纸轻轻按压脂肪, 将过多脂质去除, 可以降低切片难度。

3. 含水量大的组织: 解决办法: 用液氮速冻法可以减少冰晶。

4. 穿刺组织: 遇到穿刺组织时, 应先于冷冻头上一一次性滴加直径 2 cm 的包埋剂, 然后此冻头放在急冻台上速冻, 当包埋剂的底部开始结冻时, 将组织平放在包埋剂上, 如有多块组织将条形组织并列平行放置, 待组织结冻即可进行切片。

以上是我科做冰冻病理制片工作中的一些经验和采取的措施, 冷冻切片是术中诊断的重要方法之一, 制片质量的好坏直接影响到诊断准确性与及时性, 作为一名病理技术员要不断提高技术水平, 提高我们的服务意识, 在冰冻病理上少误诊, 做出我们的努力。

创新技术在常规制片实验室的应用

张 威

广东省人民医院病理科 510080

现代病理实验室的运行与建立应是设备精良、技术先进、环境环保, 同时具备多种特殊功能和特点: (1) 缩短样本的制备周期时间, 争取最短时间 (1~2 天) 内做出病理诊断报告, 包括免疫组织化学和电镜诊断。(2) 加强分子生物学分析; 分子生物学的研究将在未来的诊断分析中起着极其重要的作用, 而 DNA 和 RNA 的保存和抽提是关键。希望有一种新型组织固定剂, 代替目前的甲醛固定剂。(3) 建立环保型的病理实验室, 无毒性气体弥漫的工作环境, 希望做到不用甲醛固定组织, 不用二甲苯作透明剂。

针对上述功能要求,问题的焦点是集中在缩短送检标本的制备时间,一般的情况下,阅片所需时间占整个标本制备和诊断总时间的比例非常小,据有关资料统计,最顺利的情况是0.1%,最棘手的情况也仅有1.7%,而标本制备各占1048 min和1715 min(17 h和28 h),这种现状应当有所改变。减少标本制作时间,规范标本的制作程序以及保证标本制作质量,并给阅片中较为充裕的时间,才是科学的运行模式。

一、 RHS 自控微波技术在 HE 制片中的应用

2003~2004 年我科引用 RHS 自控微波新技术,该技术的特点是通过电脑微积分集合软件(PID)有效在控制微波发射功率,利用红外线感应器监控温度,采用标准化的标本制作窗口配合独特的 JFC 组织脱水液或选用国产溶液异丙醇代替 JFC。在程序上做脱水、透明同步进行。我们对各种类型的组织共 6015 块组织进行了创新条件和简化程序制作方法上的试验,并将新方法制作的组织蜡块及切片、染色结果与传统的常规石蜡制作方法作比较。

(一) 材料与方法:

1. 材料:(1)仪器:意大利 Milestone RHS 自控微波组织处理仪一套(微波仪、触摸式控制终端、真空软干燥及磁力搅拌、红外线控制器、组织处理容器瓶等器材一批)。(2)试剂:JFC 溶液(由乙醇、异丙醇和长链碳氢化合物组成的化学溶剂)、异丙醇溶液、无水乙醇溶液。(3)临床送检组织 1848 例,分为 3 组:第 1 组 658 例,第 2 组 574 例,第 3 组 616 例,每组标本均含有 36 种不同类型的组织,包括:乳腺、淋巴结、子宫肌、甲状腺、胃肠、肝、脑、肺、卵巢、胆囊、骨髓等组织。按组织大小形态分为 3 种规格:小块组织(2 mm × 2 mm × 2 mm),中块组织(10 mm × 5 mm × 3 mm),大块组织(15 mm × 10 mm × 3 mm)。

2. 方法:(1)医检组织取材后,3 组标本分别按不同程序进行脱水处理。第 1 组选用 JFC 溶液对组织进行脱水、透明、浸蜡。第 2 组选用无水乙醇+异丙醇溶液对组织进行脱水、透明、浸蜡。第 3 组选用常规脱水、透明、浸蜡制片方法(见表 1、2)。(2)将组织块放入选定(30/110 块)的组织仓架内,在玻璃容器内加入 1200 ml 的脱水剂(JFC 或异丙醇),启动触摸式控制终端,选择试验项目和预设程序,确定启动程序后屏幕显示运行曲线,曲线表示各个阶段组织脱水所需的时间、温度、压力等。(3)完成组织制片程序需要 4 个步骤,以小标本为例。第 1 步:组织固定(4%中性福尔马林)20 min。第 2 步:JFC 或异丙醇溶液同步脱水透明,约需要 18 min。第 3 步:组织在真空下进行软干燥 1.5 min。第 4 步:组织在真空 100~500 mbar 压力下浸蜡 10 min。3 组组织制成蜡块及染片后设定蜡块、切片、染色效果的评判标准,对其结果进行统计对照比较。

表 1 JFC 溶液(30 位组织仓)

规格	总时间	固定	JFC	真空	浸蜡
2 mm × 2 mm × 2 mm	50 min	20 min/50℃	18.5min /55-68℃	1.5min, 70℃, 500mbar	10 min , 66-70℃ 400-100mbar
10 mm × 5 mm × 3 mm	84 min	25 min/50℃	35 min /63-68℃	1.5min, 70℃, 500mbar	22.5 min , 70-66℃ 500-100mbar
15 mm × 10 mm × 3 mm	150min	30 min/50℃	84 min /63-68℃	1.5min, 70℃, 500mbar	33.5 min , 70-66℃ 500-100mbar
三种规格混合	14 h	常规脱水机			