

病理切片、石蜡切片制作过程中注意事项

病理切片是病理医生用来诊断患者疾病的主要手段之一。病理切片制作过程复杂漫长，影响病理切片制作质量的因素众多，常见问题归纳如下：

一、固定标本要充分及时：固定标本是制片的第一个环节；固定时间不合适或者固定不正确的组织，在染色时常会出现较浅的核质着色和轮廓不清，还会出现不同程度的片状发白区；固定液的浓度要适宜，固定标本的正确方法为：组织离体后快速放入适宜浓度的固定液中，固定液的量大约为标本体积的7倍左右，盛放标本的容器以不使标本变形为宜，大小适中。

二、规范对标本进行取材：取材的原则为：保持病变的特征和器官的完整性。尽量修除无关组织，切面尽量做到平整，原则上小标本要全部制片，大标本宜在病变部位以及病变部位与正常组织交界处多处取材。

三、及时更换试剂：在整个切片过程中，试剂的使用比较频繁，试剂的浓度改变，会影响到组织的脱水、透明、浸蜡效果，有些试剂因为挥发到别的试剂中，甚至会导致对病理组织的污染，从而产生误诊。因此，制片过程应注意观察试剂情况，根据标本量的大小及时更换试剂，确保组织处理达到要求。

四、组织包埋、切片：小块组织要采用线状包埋，大块组织要在包埋时整理平整，以防出现切片不完全或片内组织杂乱而造成诊断医师误诊[3]。切片机应随时检查刀口是否钝化，随时保持刀口锋利以防出现切片断裂、破碎的情况。切片力求完整，尽量将每块组织切到最大面，以防发生漏诊。

五、染色、封固要仔细，掌握好烤片条件：一般为60℃烤片0.5~1 h，过高温度和过长时间都会导致组织发黑，染色不清；脱蜡过程也相当重要，如果出现脱蜡不干净，那么就会出现切片不易着色和着色不匀的情况。盐酸乙醇的分化是影响染色效果的关键环节。分化不足和过度都会导致染色失败。树胶的稠度也应适中，树胶过稀过多会发生溢胶，树胶过稠过少又会出现封片不全或空泡。完成切片固封后，应及时贴好标签，防止出现混淆事故。

六、加强操作人员的工作责任心，减少因人为因素导致差错事故及坏片的发生。

病理组织石蜡切片注意事项：

一、组织固定取材

临床所取标本要新鲜，否则细胞内容酶体会破裂，造成细胞自溶。组织固定液多选用10%中性福尔马林，其有效成分为甲醛，甲醛易挥发，使得福尔马林的效用会越来越低，所以福尔马林最好现配现用；固定液体积要超过标本的10~20倍，否则固定不充分，影响染色；固定标本的容器要以使标本不变形为宜；取材时，除严格按照病理标本取材操作规范外，小标本一般全取，大标本在去除不必要的组织后，要特别注意病变部位与正常组织交界处；取材切片观察面要平整，否则组织经脱水后变韧，导致组织包埋时不能压平于包埋盒中，切片时修整蜡块很繁琐。

二、脱水包埋

现组织多采用程序化脱水浸蜡，所以要根据标本的多少及大小及时更换脱水机内试剂，否则会影响脱水效果，使组织与蜡不能相溶，无法制作出合格的组织蜡块。条件允许的情况下可根据组织标本的不同选择合适的石蜡，组织韧性大选择高熔点石蜡，组织软选取低熔点

石蜡。包埋时，组织要充分压平于包埋模底部，以保证组织的预期观察切面在同一水平；先向包埋盒中灌滴少许液体石蜡，此步骤可使成型蜡块底部光滑平整，再将组织观察面压平于包埋盒底部，组织摆放紧凑但不重叠。为使包埋组织的蜡块快速凝固，一般先将浸液体蜡的包埋盒置于冷冻台上，蜡块在置于冷冻台上后，应在蜡大部分或完全凝固后，再移动包埋盒；若蜡块未完全凝固，而移动了包埋盒，成型蜡块底部平整度相差甚远，有的凝固蜡块底部平整，有的蜡块底部不平整，可致小标本在修片的过程中被浪费。

三、切片

切片时常见问题及常用解决方法如下：

- (1) 切片横向褶皱过多，不能成带。原因：蜡块温度过高；切片刀变钝；切片刀边缘粘有少量石蜡。解决方法：将蜡块重新放置冰袋或冷冻盒上，使蜡块降温；更换切片刀的位置，或换新的切片刀；或用水沾湿纱布，顺切片刀刀口方向，轻轻擦拭切片刀。
- (2) 切片上有位置固定的一道或几道裂缝或裂纹。原因：切片刀有小缺口；蜡块内有杂质或体积较小的似骨（钙）化性较硬的组织；包埋时蜡块不均匀凝固。解决方法：移动切片刀或更换新的切片刀；用少量盐酸软化硬的钙化性组织；重新包埋蜡块。
- (3) 切片上有位置不定的数道小裂缝或裂纹。原因：蜡块温度过高；切片刀变钝。解决方法：将蜡块重新放置冰袋或冷冻盒上，使蜡块降温；更换切片刀的位置，或更换新的切片刀。
- (4) 切出的蜡条明显向一侧弯曲变形。原因：弯曲处蜡块质地不均，蜡块未修整好，边缘毛糙等；弯曲处切片刀变钝。解决方法：重新修整蜡块；移动切片刀；冷冻蜡块，蜡块质地稍变硬后也可以使弯曲变小。
- (5) 切片厚薄不均，或是每固定几片后，切出一张完整的片子。原因：蜡块过硬或过大；蜡块夹持器或切片刀松动；切片机微动失灵，不能调节出正确的切片厚度。解决方法：组织块过硬可重新取材包埋，过大可重新包埋；调整机器，上紧刀片；修理机器。

四、漂片注意事项

漂片温度选择比蜡块熔点低10℃即可。温度过高会使蜡条产生数目不等的小气泡。

五、烤片注意事项

烤片时温度与时间的选择范围广，可从37℃烤箱烤干1天至75℃烤箱烤干20min，可以根据不同目的需要，确定烤片时间和温度，或是依石蜡熔点来确定，一般将温度控制比石蜡熔点高10～15℃。

六、染色注意事项

- (1) 组织脱蜡透明等过程采用物质分子相似相溶原理，试剂有效成分容易减少，所以脱蜡试剂要及时更换，若脱蜡不充分，会使切片染色不均匀；因乙醇、二甲苯等易挥发，故在操作完成时，应及时封盖，溶液浓度降低会影响洗片效果；
- (2) 染色时，盐酸乙醇分化步骤尤其重要，分化的目的是使胞核染色，而无背景色。明矾苏木精性质使其在酸性溶液中呈现红色，在碱性溶液中呈现蓝色。在盐酸乙醇分化时，切片由深蓝变为粉红色时，应停止分化。分化时，有经验者可以肉眼观察切片至粉红色时终止分化，初学者可镜下多次观察切片，至切片除胞核外，无其他背景着色时，停止分化；或是依据盐酸乙醇浓度，确定分化时间，试剂初配制时，盐酸乙醇浓度高，分化时间短，反之则分化时间延长。切片分化完成后，将切片移至弱碱性的溶液中返蓝，一般采用自来水，或是温度在50℃的自来水中，因其本身为弱碱性，且取用方便，所以被广泛使用。

七、封片注意事项

- (1) 需吹干或烤干切片上水分，否则镜下观察时有一层白雾，导致细胞轮廓不清楚；
- (2) 病理组织切片HE 染色一般采用中性树胶封片，封片时以无气泡为准，否则会影响镜下观察；常用24 mm × 32 mm 大小的盖玻片，只需用一次性的巴氏吸管滴二滴中性树胶即可，过少则致封片不完全，过多则致中性树胶外溢。