

中国人类遗传资源 疾病固定组织收集整理保存技术规程

Technical Specification for the Fixed Tissue
Collection and Trimming and Preservation
of Chinese Disease Genetic Resources

(讨论稿)

• 中国人类遗传资源平台项目组

2006 年 8 月

前 言

适当的组织固定、准确的大体检查、正确的取材是优质病理工作的前提，任何固定不及时或处理不当的组织标本，都可能导致产生假阳性或假阴性的实验结果，影响病理诊断和研究的准确性。病理大体标本是医疗、教学、科研工作中重要的档案材料，病理医师在日常工作中应注意收集、制作有价值的大体标本，这是一项长期连续的工作，意义深远；同时组织固定又是后续石蜡包埋组织切片进行疾病诊断及相关发病机制研究的前处理过程，因此疾病组织的固定规范化操作并建立完善的标本管理与应用制度非常重要。

目前，我国尚无关于人类疾病固定组织收集整理保存工作的国家标准，为使我国相关工作有章可循，规范操作和管理，我们根据目前的研究积累，参考国际相关做法，同时结合中国国情，制定本规程。

目 次

前 言.....	II
1 范围.....	1
2 规范性引用文件.....	1
3 术语和定义.....	1
4 实验室及工作区的条件.....	2
4.1 标本接收室.....	2
4.2 组织标本大体检查和取材室.....	2
4.3 病理档案资料室.....	3
4.4 特殊检测实验室.....	3
5 固定液的选择.....	3
5.1 单纯固定液.....	3
5.2 混合固定液.....	4
6 标本的固定.....	5
6.1 标本的固定.....	5
6.2 组织固定需要注意的问题.....	6
7 大体检查.....	6
7.1 小标本检查.....	6
7.2 大标本检查.....	7
8 组织取材.....	7
8.1 取材的一般原则.....	7
8.2 取材注意事项.....	7
9 记录.....	8
10 标本的保存.....	8
11 标本的管理与使用.....	9
11.1 标本的管理.....	9
11.2 标本的使用.....	9
12 废液的处理.....	10
参 考 文 献.....	11

人类疾病固定组织收集整理保存技术规程

1 范围

本规程适用于与人体疾病固定组织标本相关的诊断、医学及司法鉴定、教学、科研操作，因此在医院、司法机关、大学和科研单位应规范执行。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本规程的引用而成为本规程的条款。凡是注日期的引用文件，其随后所有的修改单（不包括勘误的内容）或修订版均不适用于本规程，然而，鼓励根据本规程达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件，其最新版本适用于本规程。

GB/T 1.1-2000 标准的结构和编写规则

GB 19489-2004 生物安全通用要求

● ISO 15189 医学实验室质量和能力的专用要求

ICD-10 WHO 国际疾病分类编码

CNAL AC23-2003 医学实验室认可准则

《人类遗传资源管理办法》

《遗传资源的伦理》

《遗传资源的共享原则》

《赫尔辛基宣言》

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准：

3.1 人类疾病固定组织资源

是指可经过固定保存或固定后进行其它操作的人体各种疾病组织材料及相关信息资料。

3.2 标本

为了进行疾病的临床诊断、治疗及相关的研究工作，所切取或采集的人体

各组织器官的样本。

3.3 固定

把标本浸泡在某些化学试剂中(一种或多种混合液),使细胞内蛋白质凝聚、沉淀或变性成不溶性物质,并保持组织细胞原有形态结构的过程。

4 实验室及工作区的条件

病理科各实验室及工作区,特别是取材和固定标本的地方,不仅要保证工作任务的完成还要保护病理工作人员以及周围环境免受污染和伤害。与固定组织的收集整理及保存有关的工作空间包括标本接收室、组织标本大体检查和取材室、特殊检测实验室及病理档案资料室。

4.1 标本接收室

负责组织标本的接收及登记等工作。除具备必要的办公设施外,还应具有用于活检申请单及相关物品等消毒用的紫外线消毒柜或其它消毒装置。负责人员必须严格遵照相关工作规程,以确保标本的安全。细则如下:

a) 同一患者的申请单和标本必须同时接收,仔细核对每例申请单与送检标本(标本份数和标本内容)及联号是否相符;仔细检查标本是否完整;对于小活检标本(经内窥镜或细针穿刺取材得到的标本)来说,更要认真核对容器内的组织及其数量;

b) 查阅申请单的各项条目是否填写清楚;

c) 在已验收的申请单上编写病理号或标本号,并及时准确地逐项录入登记本和计算机内。

d) 建立验收人员与组织取材人员间申请单和标本的交接制度。

4.2 组织标本大体检查和取材室

大体检查和取材室要符合如下要求:

a) 便于清洗、消毒的屋顶、室壁和地面;

b) 室内具有紫外线消毒设备;

c) 室内具有高效通风设备,室内空气质量,达到国家要求的工作环境标准;

d) 具有封闭式高效能通风的大体检查及取材台,配备充足照明和紫外线消

毒设备以及流水冲洗装置；

- e) 具有符合个人和环境防污要求的上、下水系统；
- f) 具有配备排风设备的标本存储柜；
- g) 操作人员要着消毒的隔离服装。

4.3 病理档案资料室

档案必须存放于具有通风设施、空间较大、温度适宜的房间内，采用专门设计的密集柜和陈列柜等储存标本和资料，同时应配有登记簿，并具备灭火设备等辅助设施。

4.4 特殊检测实验室

根据相关实验、诊断和研究的需要，病理科还应尽量配有电子显微镜超微病理诊断室、免疫组化室、流式细胞分析室（FCM）、聚合酶链反应实验室（PCR）、细胞遗传和分子病理实验室等。

5 固定液的选择

按要求将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，所以标本固定是整个组织标本处理过程中的重要环节。影响标本固定的因素很多，如组织与固定液的比例、固定时间、固定温度等；除此之外，固定液本身也很重要，若所选固定液不当，细胞内蛋白质、脂类、核酸等成分将会有不同程度地损失。因此根据实际工作的目的，选用合适的固定液非常重要。下面是一些常用固定液的配制方法及适用范围。

5.1 单纯固定液

5.1.1 4%中性甲醛（10%中性福尔马林）固定液

最常用的固定液。一般无特殊要求的病理标本均适用。尤其值得注意的是，中性甲醛是以 pH 7.2~7.4 的磷酸缓冲液为溶剂配制的，其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。此固定液配制后应密封并保存在阴凉处，保存时间不超过一个月。

甲醛（40%）	100ml
无水磷酸氢二钠	6.5g
磷酸二氢钠	4.0g
蒸馏水	900ml

5.1.2 乙醇固定液

使用时以 80%~95%的浓度为宜，具有硬化、固定、脱水等作用，对组织渗透力较弱，因此很少单独使用。但如果用于证明尿酸结晶和保存糖原，可用 100%乙醇固定组织。

5.2 混合固定液

5.2.1 乙醇—甲醛（酒精—福尔马林，AF）固定液

适用于皮下组织中肥大细胞的固定。该固定液有固定兼脱水作用，固定后的标本可直接入 95%乙醇脱水。

甲醛（40%）	100ml
95%乙醇	900ml

5.2.2 B5（醋酸钠—升汞—甲醛）固定液

多用于固定淋巴组织。染色前应进行脱汞沉淀处理。

无水醋酸钠	1.25g
升汞	6.0g
蒸馏水	90ml

使用前加入甲醛 10ml。

5.2.3 Bouin 固定液

特别适用于睾丸活检组织的固定。Bouin 液对组织固定较均匀，收缩很少，不会使组织变硬变脆。需现配现用。

饱和苦味酸水溶液（约 1.22%）	75ml
甲醛	25ml
冰醋酸	5ml

5.2.4 Carnoy 固定液

穿透能力强，可很好的固定细胞质和细胞核，特别适合于固定外膜致密的组织，亦适用于糖原及尼氏小体的固定。

无水乙醇	60ml
氯仿	30ml
冰醋酸	10ml

5.2.5 Zenker 固定液

经此液固定的标本，细胞核和细胞质染色颇为清晰，但成本较昂贵且需特殊处理汞。

升汞	5.0g
重铬酸钾	2.5g
硫酸钠	1.0g
蒸馏水（加至）	100ml

该固定液要避免接触阳光，以免引起化学变化而失效。

6 标本的固定

临床医师切取标本后，应尽快将标本置于盛有固定液的容器内，尽量避免可能出现的固定不及时或不充分的情况，因干涸或腐败的标本，无法再进行固定和用于制作切片，这对临床病理工作造成的巨大损失是无法弥补的，所以病理科工作人员验收标本后，必须对临床初步固定的标本及时进行系统地、规范地处理。

6.1 标本的固定

固定的目的在于：

a) 保持离体组织细胞与活组织时的结构和形态相似，防止组织自溶及细菌繁殖所致的腐败。

b) 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。

c) 便于光镜下对细胞内不同成分进行区别。组织细胞内不同成分沉淀凝固

后折光率及对染料的亲和力将有所不同，染色后可加以区别。

d) 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。

e) 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、免疫组化分析、细胞遗传和分子病理学检查，以及相关科研等。

6.2 组织固定需要注意的问题

a) 组织固定时，要选择广口瓶或标本缸，应有足够量的固定液，一般为标本体积的 5~10 倍为宜，避免组织贴于容器底或容器壁而影响固定液的渗入。一般固定液在 24 小时内不能穿透厚度大于 2~3mm 的实体组织或 0.5cm 的多孔疏松组织，因此实体器官（肝、脾等）需间隔 1.0~1.5cm 平行剖开，每片平放于容器中固定；空腔器官（食管、胃肠道等）需依照规范方法剪开后平铺于硬板上，用大头针将标本边缘固定，粘膜面朝向容器内液体的液面固定；放入固定液中的肺叶标本表面需覆盖浸含固定液的薄层脱脂棉。

b) 固定时间视组织的种类、大小以及固定液种类而定。一般活检小标本固定 4~6 小时，手术大标本为 18~24 小时为宜。

c) 大多数标本可在室温（25℃）固定，在低温（如 4℃）固定时应适当延长固定时间。

d) 固定期间需要间断轻摇或搅动固定液，利于固定。

e) 整个固定过程中标本必须始终连带其病理号。

f) 多数固定液对人体有害，必须在密闭通风的条件下操作。

7 大体检查

对送检标本的观察和描述，可分为活检小标本（包括经内窥镜获取的粘膜组织、浅表或深在部位的穿刺物、子宫腔刮取物、经微创手术由器官或肿瘤中切取的不完整组织等）和手术大标本。

7.1 小标本检查

描述送检标本的数量（量少时精确计数）、大小（量少时精确测量，量多时聚堆测量体积）、色泽、形状以及质地等。

7.2 大标本检查

a) 检查切除标本的手术类型。

b) 测量标本的大小；描述标本的形状、色泽、有无包膜或被膜及质地，必要时要在（如内分泌肿瘤）切开标本前称重；带有脏器的标本还应注意检查病变与有关脏器的比邻关系。

c) 按操作规范切开检查标本切面，如实性区域观察色泽、质地、纹理、有无出血坏死以及肿瘤肉眼浸润深度和范围；囊性区域观察囊肿壁的厚度、内外表面、内容物及其性状等。

d) 注意各系统脏器大体检查的特殊要求。

e) 必要时绘制简图说明标本大体特点和解剖关系，也可进行表面及剖面摄影，以保存大体资料。

8 组织取材

按病理诊断和研究的目的和要求，从标本上切取适当大小和数目的组织块，供后续制片和显微镜下观察用于诊断，以及相关研究。

8.1 取材的一般原则

a) 认真地进行大体检查，准确选取病变部位。

b) 显示病变全貌，切取有代表性的病变区域组织，包括病变周边相对正常的组织和坏死组织等；对有肿瘤的标本应包括切缘、肿瘤包膜及转移部位等。

c) 组织块的面积通常为 $2\text{cm} \times 1.5\text{cm}$ ，厚度不超过 3mm 。太大太厚的组织块常会固定不充分，而影响脱水和制片。组织块的数量依具体情况而定，一般以满足诊断和相关研究需要为准。

d) 骨或钙化组织需要先经脱钙处理；腔道器官及囊壁组织应立埋。

8.2 取材注意事项

a) 每例标本取材前后，均应用流水彻底清洗取材台面和所有相关器物，避免交叉污染。

b) 细小标本取材时可用伊红点染并用滤纸包裹，严防标本丢失。

c) 取材刀刃要锋利，避免使用钝刀或齿镊过度挤压组织，取材动作要轻柔，

不可来回切割或过度牵拉组织，以免组织结构变形或内部细胞脱落。

- d) 组织块切面应平整，如有线结和钢丝应拔除。
- e) 所取组织应包括各脏器的重要结构或全层。

9 记录

大体检查和取材要由具有一定经验的病理医师进行，应配备人员进行记录。

记录人员负责如下事宜：

- a) 每例标本在病理医师进行大体检查和取材前，与其共同核对该例标本份数、内容、病变特征及其标志是否与申请单相关内容一致。
- b) 病理医师在进行大体检查和取材时，记录人员根据申请单向医师报告病人基本情况、术中所见、送检医师特殊要求等，并如实清楚地将病理医师口头描述记录于记录单上，必要时绘制简图显示大体所见及标示取材部位。
- c) 病理医师取材完毕后，与其共同核实取材内容，确保组织块及其编号标签准确置入脱水盒内，并在记录单和取材工作单上签名并签署日期。

10 标本的保存

标本取材后剩余的组织 and 器官应放回固定的密封容器内，附上病理号及其相关标志，添加足量固定液以备复查之用。取材剩余标本一般保存一个月或病理诊断报告书发出后两周。

对典型具有教学或供日后临床病理讨论和科学研究用的标本，可制备成大体组织标本室温下长期保存。常用方法如下：

- a) 甲醛液浸存法

新鲜标本用 4% 甲醛固定 5—10 天后，用流水冲 12—24 小时，然后用纱布轻轻吸去水分，移至过滤的 4% 甲醛液中长期保存。此方法操作简便，但不能保持标本原色。

- b) 原色组织标本制作法

最常采用的为凯氏法 (Kaiserling)，分三步进行：

第一液 (固定) 4% 甲醛

第二液（回色） 95%乙醇

第三液（浸存）

甘油 200ml

醋酸钾 100g

麝香草酚 2.5g

蒸馏水 加至 1000ml

c) 透明标本制作法

应用化学、物理方法使组织折光率与透明剂折光率相近而获得透明的效果。最常用血管灌注透明法，以明胶做为填充剂。

d) 管腔灌注标本制作法

通过向器官的血管、肺脏的支气管及肝脏的胆管等管腔内灌注胶体物质（明胶或乳胶填充剂），显示组织正常或异常结构。

e) 管腔铸型标本制作方法

● 通过对标本的铸型，显示心脏、脑、肾脏等器官的血管，以及肺脏的气管支气管和肝脏胆管的走行与分布。

11 标本的管理与使用

11.1 标本的管理

由于每一大体标本都是不可再生的资源，因此管理工作异常重要。保管人员必须具备一定的医学知识（至少为医学相关中专以上毕业生），熟悉大体标本的各种制作方法及保存注意事项，懂得医学档案资料管理，同时要有非常强的医学责任心，并能严格按照规章制度办事。

每一标本背面均应附有病理号，标本缸外也要附以标签纸，并书写病理号及病理诊断。应有专门的病理档案资料室存放大体标本，使用专门设计的标本陈列柜，室内要放有登记簿并配备其它相关设施。

11.2 标本的使用

- a) 在医疗机构，用于记录医学病案，供患者疾病的诊断；
- b) 经相关机构批准，用于科学研究；

- c) 保存少见和罕见疾病，随着医学的发展，用于回顾性诊断和研究；
- d) 用于临床病理的讨论工作及医学教学；
- e) 在患者同意或要求下，经保存单位批准可用于其他合理方面，详见《遗传资源的伦理》与《遗传资源的共享原则》。

12 废液的处理

取材后剩余的病理标本及废弃的固定液属于医学污染源，应严格按照相关法律法规及本医院的规章制度集中处理。

参 考 文 献

- [1] (英)C. F. A. 卡林著, 孔庆雷译. 组织病理学与组织化学技术手册. 北京: 科学出版社. 1982
- [2] 李学农主编. 现代病理与实验诊断技术. 北京: 人民军医出版社. 2003
- [3] 中华医学会编著. 临床技术操作规范: 病理学分册. 北京: 人民军医出版社. 2003
- [4] 徐思行, 余心如主编. 病理诊断与技术规范. 浙江: 浙江大学出版社. 2003
- [5] Juan Rosai. Surgical Pathology. Ninth edition. Mosby. 2004
- [6] Weidner, Cote, Suste, Weiss. Modern Surgical Pathology. Saunders. 2003