

消化内镜黏膜活检标本病理切片制备规范化处理专家共识

中国医师协会医学技师委员会病理技术专家组,中国医学装备协会病理装备分会标准化部,中国研究型医院学会病理学专业委员会病理技术学组,中国抗癌协会肿瘤病理专业委员会病理技术学组

关键词:消化内镜黏膜活检;病理技术;专家共识

中图分类号:R-33 文献标志码:A

文章编号:1001-7399(2024)06-0567-05

doi:10.13315/j.cnki.cjcep.2024.06.002

消化内镜黏膜活检是诊断消化道病变的重要手段,因活检标本体积小、组织碎,还常因多种因素(如灼烧、挤压等)导致组织变形,这些因素均增大了组织包埋和病理诊断的难度,导致病理报告不能完全反映消化道黏膜病变性质^[1-3]。内镜室活检标本取材和病理制片不规范可能导致以下问题的出现^[4-6]:内镜活检标本较大,病理报告仅描述为取材表浅;内镜下见较倾向肿瘤性病变或黏膜明显呈萎缩性改变,病理报告仅诊断为慢性非萎缩性胃炎。研究表明,活检部位和数量是导致诊断假阴性的关键因素^[7-9]。通过对送检标本的大体形态观察发现,常规处理的活检标本即从活检钳内取出后未展平并随机吸附在滤纸上,大小明显小于规范化处理的活检标本,多数卷曲变形或呈弧形,病理技术员在后续操作中难以明确标本组织层次,增大包埋难度,可能导致 HE 染色切片未显示黏膜纵切面,同样干扰诊断结果^[10]。综上所述,上述因素均影响病理诊断医师对活检标本组织全层或有病变层面^[11-12]的观察。因此,需要制定消化内镜黏膜活检标本病理切片制备流程规范,以提高病理诊断的准确率。

1 消化内镜活检规范

1.1 标本离体后处理原则

取材的活检标本要是够大,深度尽可能达到黏膜肌层^[13]。最大径 $<0.5\text{ mm}$ 息肉标本,可用活检钳或热活检钳直接钳除。标本取自不同部位,应标注部位,分开放置。滤纸备用,标本离体后用小镊子从活检钳取出、展平,仔细辨认方向,将基底面贴附于滤纸上,该步骤是病理切片呈现黏膜纵切面的关键因素^[14]。

1.2 标本盛放容器 采用内含 10% 中性缓冲福尔马林的一次性标本瓶(图 1)。标本在放置过程中应防止标本瓶倾倒,以避免标本未浸泡于固定液中(尽量避免使用无法直立的塑料标本袋)。

1.3 标本固定 活检标本离体后立即固定。固定时间(包括取材前固定时间和取材时固定时间、取材后固定时间)必须在 6~8 h 以上,以最大径 ≤ 2 mm 为最低标准值,当标本 >2 mm 时需延长固定时间或提高固定液的温度(最高温度不宜超过 37℃)。



图1 消化内镜活检一次性标本瓶

2 取材规范

2.1 标本核对 取材前,记录员与取材医师需核对患者姓名、年龄、送检部位和组织数量。

2.2 标本取材

活检标本体积较小,为防止丢失,推荐使用市售组织包埋纸包裹(图2A)^[15]。将组织包埋纸平铺于取材台,取出标本置于纸上,测量大小并记录数量。活检标本大小不一,为利于观察包埋方向以及保证包埋面平整,每个脱水盒标本数应 ≤ 3 块^[16]。要注意:使用单层包埋纸包埋组织,勿用多层或外面包裹纱布,避免组织在处理过程中试剂难以浸透组织或纱布携带过多液体影响脱水质量。取材医师应按“四折叠法”折叠包埋纸,避免对齐对角线,留一定角度便于技师包埋时打开(图2B~F)。取材医师打开标本瓶时需检查瓶盖有无标本残留,夹取时小心谨慎,防止掉落,遵循取完一个标本清洗一次镊子的原则,避免交叉污染。脱水框中放置包埋盒固定槽,确保包埋盒之间留有一定缝隙,便于固定液渗透,避免标本排列过于紧密影响脱水效果;取好的标本应立即浸入固定液中,避免将标本长时间放置于取材台面而致干涸,从而影响了后续制片质量。

2.3 包埋盒核对

取材结束后,取材医师和记录员需核对病理号和包埋盒数量,与病理技师进行交接并在底单签字确认,有条件者可拍照备查,最后选择脱水机对应脱水程序进行标本处理。

3 组织处理规范

3.1 设备(脱水机) 除少数单位采用手工脱水外,目前大多采用脱水机处理组织。为确保样本脱水的安全性,推荐使用

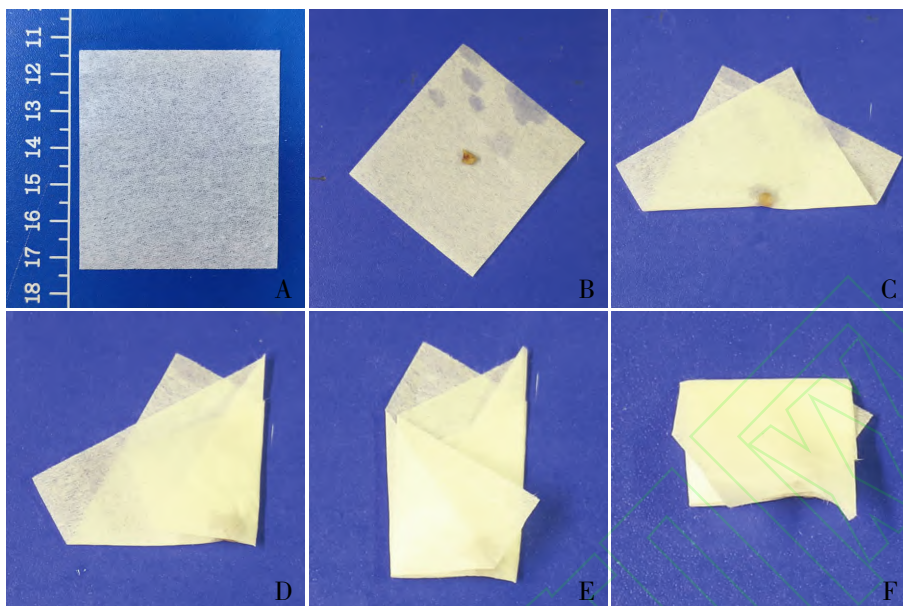


图2 消化内镜活检标本包埋纸(A)和黏膜活检标本“四折叠法”包裹示意图(B~F)

用全封闭式组织脱水机(不建议使用提式脱水机,因其发生故障时易卡缸,导致标本悬挂空中而干涸,最终影响病理诊断)。

3.2 活检标本标记 活检标本经曙红染液上色,利于识别过小的组织以及观察内镜黏膜组织的结构。传统方法是取材时将曙红染液滴加于标本上,由于曙红的最佳着色 pH 为 4.5~5.5,随着 pH 升高,着色能力越来越弱,当 pH>6 以后,几乎不着色。因此,当组织经过脱水机内的中性缓冲福尔马林固定后(pH 值为 7.0~7.6)变得无色。改良的方法是在任意一道脱水乙醇中(一般放在最后一道)添加少量曙红染液或粉剂(添加的剂量需进行性能验证,以上皮层、固有层呈浅红色,黏膜肌呈深红色为佳)^[17-19]。

3.3 取材后组织固定 取材结束后,根据各单位活检标本取材前固定情况,将标本放入全封闭式脱水机中的 10% 中性缓冲福尔马林中继续固定 1~5 h,温度 35~37℃。

3.4 水洗 为减少固定液内磷酸盐和甲醛带入脱水乙醇并残留于组织内,影响组织蜡块长期保存,活检标本固定后,建议水洗后再进入脱水流程。

3.5 组织处理流程 固定充分、脱水彻底是保障活检标本组织处理优良的关键,包括组织处理时间应充足及试剂浓度应准确(尤其最后一道乙醇浓度和二甲苯纯度)。固定和脱水时间不足,浸蜡过程中高温可使含水乙醇、二甲苯混合液挥发,导致组织干燥发硬、发脆。在标本固定充分的前提下,长时间脱水、透明不会对后续 HE 染色带来不良影响^[20]。小标本组织处理流程:在 10% 中性缓冲福尔马林中 37℃ 固定 1~5 h、自来水冲洗 10 min、75% 乙醇 37℃ 60~90 min、85% 乙醇 37℃ 60~90 min、95% 乙醇(I) 37℃ 60~90 min、95% 乙醇(II) 37℃ 60~90 min、100% 乙醇(I) 37℃ 60~90 min、100% 乙醇(II) 37℃ 60~90 min、二甲苯(I) 37℃ 30~45 min、二甲苯(II) 37℃ 30~45 min、石蜡(I) 60~62℃ 30 min、石蜡

(II) 60~62℃ 60 min、石蜡(III) 60~62℃ 90 min。

3.6 脱水试剂更换流程 为保证组织脱水效果,脱水试剂应定量更换。更换原则:尽可能保证各道试剂浓度、量、洁净度。更换方法:每缸 5 000 mL 试剂,组织块达 1 500~1 800 块,更换 10% 中性缓冲福尔马林、水、75% 乙醇、85% 乙醇;95% 乙醇(II) 移到 95% 乙醇(I),95% 乙醇(II) 更换新的试剂;100% 乙醇(II) 移到 100% 乙醇(I),100% 乙醇(II) 更换新的试剂;二甲苯(II) 移到二甲苯(I),二甲苯(II) 更换新的试剂,石蜡(III) 移到石蜡(I),石蜡(III) 更换新的石蜡。

4 组织包埋规范

消化道黏膜分为食管黏膜、胃黏膜和肠黏膜,包括上皮层、固有层和黏膜肌^[21]:(1)食管黏膜(图 3A、B):上皮层为非角化的复层扁平上皮。(2)胃黏膜(图 3C、D):上皮层为单层柱状上皮。固有层可见胃体腺或幽门腺。(3)肠黏膜(图 3E、F):小肠可见绒毛和潘氏细胞;大肠无绒毛,上皮较光滑,肠腺含有大量的杯状细胞;黏膜肌位于黏膜的最深层。由于标本钳取的深度不同,HE 切片观察到的组织层面也不同。为防止误诊、漏诊,选择正确包埋面非常重要。

4.1 窄面标本 标本离体后展平贴附于滤纸上,此类标本外观较平直。上皮层较薄,类似瓢虫壳样,上带或不带褐色斑点。紧挨上皮层为固有层,较疏松透明呈海绵状,为灰红色。此类标本可用窄面包埋法,选择最窄、最长面包埋^[22],也可采用颜色分辨法,先分辨灰白、灰黄色上皮层,再分辨灰红色固有层,最后确认两者交界处的白线(白线为竖立包埋后的上皮层),此面即为黏膜纵切面,竖埋后的组织应呈细长条状(图 4A)。

4.2 形状不规则标本 (1)卷曲状标本:标本离体后未展开平铺于滤纸上导致卷曲变形,此类标本与窄面标本不同,不能采用窄面包埋法,应采用颜色分辨法包埋。由于上皮层将

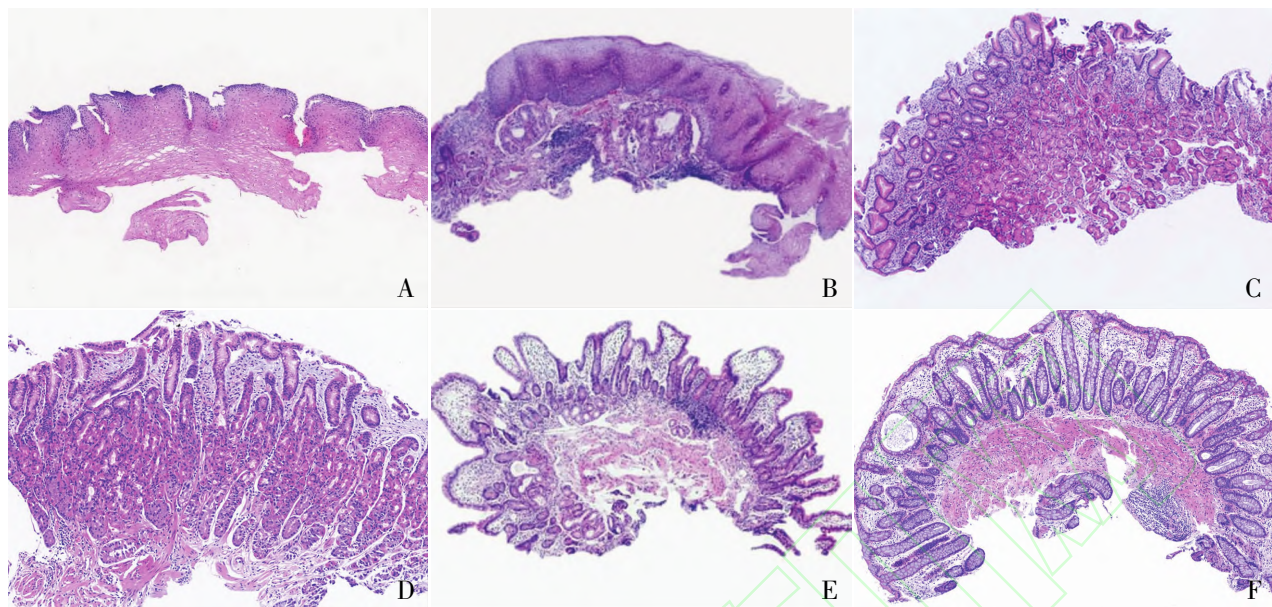


图3 消化道各部位黏膜组织结构:A.食管黏膜,可见非角化的复层扁平上皮;B.食管黏膜,可见上皮层、固有层(含固有腺体)和黏膜肌;C.胃窦黏膜,可见上皮层、固有层(含幽门腺)和黏膜肌;D.胃体黏膜,可见上皮层、固有层(含胃体腺)和黏膜肌;E.十二指肠黏膜,可见绒毛、固有层(含潘氏细胞)和黏膜肌;F.直肠黏膜,可见上皮层、固有层(含肠腺)和黏膜肌

固有层包裹在其中(图4B),确认上皮层与固有层交界处即为黏膜纵切面,朝下包埋即为竖立包埋。严重卷曲可似宝螺形(图4C、D)或西湖莼菜形。此类标本上皮层和固有层的分界线在卷曲的尖端最为明确,包埋时将尖端朝下包埋即为竖立包埋(图4D)。(2)夹心状标本:此类标本钳取部位较深,故带少许黏膜肌。肉眼观察标本组织层次饱满分明,采用颜色分辨法从外到内依次呈现灰白灰黄色上皮层、灰红色固有层和深红色黏膜肌,其中黏膜肌染色较红,最明显,外观有V字形(图4E)、U字形(图4F)等。包埋时先辨识黏膜肌,为细条或点状,由固有层包绕,上皮层位于最外层包裹固有层,此面即为黏膜纵切面,将其朝下包埋即为竖立包埋。(3)菜花状标本:此类标本外观呈菜花形,灰白色,肉眼无法分辨上皮层和固有层交界处,较少见。若带有黏膜肌同夹心状标本包埋方法;若未带黏膜肌,将菜花朝向四周包埋即为竖立包埋。(4)小息肉标本:此类标本外观呈球形、椭圆形或布袋形,带或不带蒂部,外周均为灰白、灰黄色上皮层,离断处呈灰红色。辨认离断处,将其朝向四周放置即为竖立包埋(图4G、H)。

5 切片和染色规范

5.1 切片和捞片 将包埋好的蜡块按序放在冰水混合物上,若蜡块冷冻温度过低,切片组织细胞在镜下呈裂隙状;蜡块太热则使切片不易展开,皱褶较多^[23]。为避免漏诊,每个蜡块应切片6~8张,待温水展平后,选择平整、无皱褶蜡片捞于载玻片上(图5)。

5.2 控水 捞片后将载玻片竖立放置控水10~30 min,避免组织移位及细胞核空洞样改变,有学者^[24]把后者产生的原因归属于切片从水中裱起后就立即受热过度(温度高于60℃以上)。

5.3 烤片 将染色架置于70~80℃烤箱中烤片30~60 min。烤片时间由载玻片和石蜡特性决定,时间短,蜡片上的水没有烤干,会导致染色不均匀,甚至会出现脱片现象;时间过长,HE染色形态虽显示完整,但整体染色效果差,特别是胞核染色淡,如果蜡片上的蜡被烤干,还会出现棕色烤焦的细胞。

5.4 HE染色和封片 染色前用提前备好的胃镜组织预染切片,根据各单位染片数调整染液时间,尽量保证每天的苏木精和曙红染色深浅一致。染色步骤:二甲苯(二甲苯2×5~10 min)→95%乙醇(3×1 min~3×3 min,经多家医院长期大批量使用对比,脱蜡梯度乙醇可全部使用95%乙醇或无水乙醇替代,效果更好)→水洗(1 min)→苏木精染色(5~15 min)→水洗(3 min)→0.5%盐酸乙醇分化(1 s)→水洗(3 min)→蓝化(3 min)→水洗(3 min)→伊红染色(1~20 s)→水洗(15~30 s)→100%乙醇(3×3~5 min)→二甲苯(3×3~5 min)→封固(各试剂作用时间不同,实验室可根据实际情况作适当调整)。染色过程中让切片干涸,染色后直接把切片置入烤箱烤干或吹风机吹干封片前过度干燥,有可能出现“裸核”现象,即部分胞核透明不良,镜下细胞核呈黑色,重新封固后“裸核”即消失。

5.5 试剂更换 染色试剂和染液要定量或定期更换。定量更换(根据染色缸容量不同折算切片数量):每天500 mL试剂、切片数量600张以内,更换第一道脱蜡二甲苯和脱蜡95%乙醇;每天切片数量600~1 200张,更换两道脱蜡二甲苯和两道脱蜡95%乙醇;每天切片数量1 200~1 800张,更换两道脱蜡二甲苯和三道脱蜡95%乙醇;苏木精每500 mL推荐染片量1 500~2 000张,若出现胞质着色,可滴加1~2滴冰乙酸调节pH值;曙红每500 mL推荐染片量1 500~

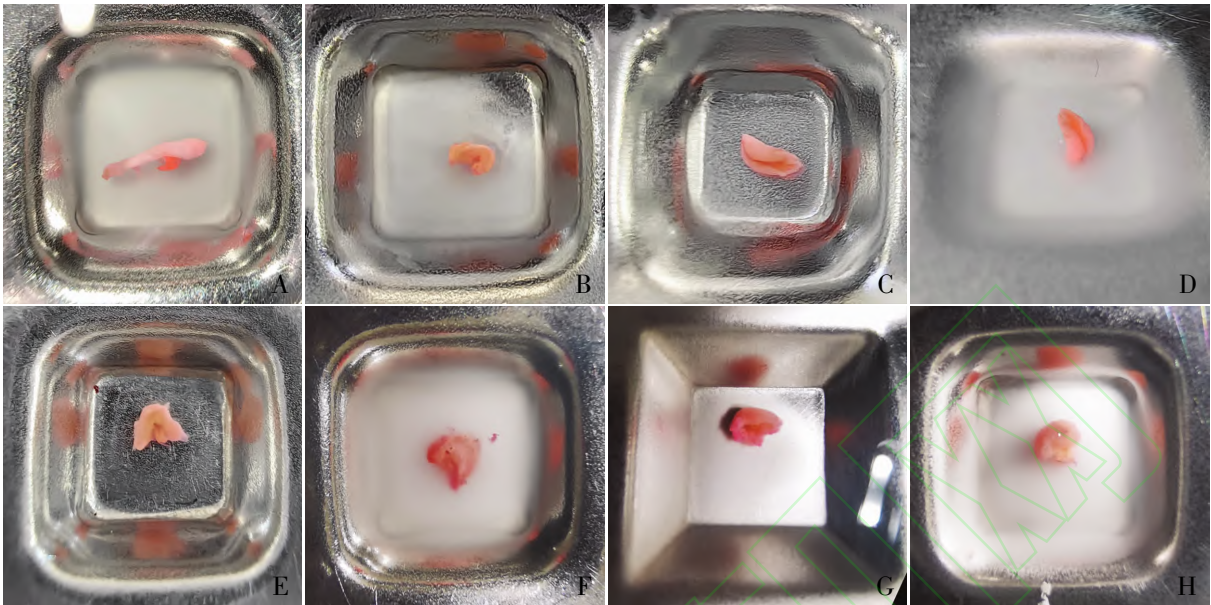


图4 消化内镜活检标本包埋方法:A、B. 窄面标本竖埋状态:采用颜色分辨法,上皮层最易辨识,为灰白、灰黄色,较薄,类似瓢虫壳样,上带或不带褐色斑点,竖埋后呈一条白线。此类标本竖埋后呈细长条状;C. 卷曲状标本(宝螺形):可见灰白、灰黄色上皮层包裹灰红色固有层,此标本为未竖埋状态;D. 卷曲状标本(宝螺形)竖埋状态:上皮层和固有层的分界线在卷曲的尖端最为明确,将卷曲的尖端朝下包埋;E、F. 夹心状标本(夹心处为黏膜肌)竖埋状态:可见灰白、灰黄色上皮层包裹深红色黏膜肌;G. 小息肉标本(未带蒂)竖埋状态:离断处(豁口)朝向四周包埋;H. 小息肉标本(带蒂)竖埋状态:灰红色蒂部朝向四周包埋

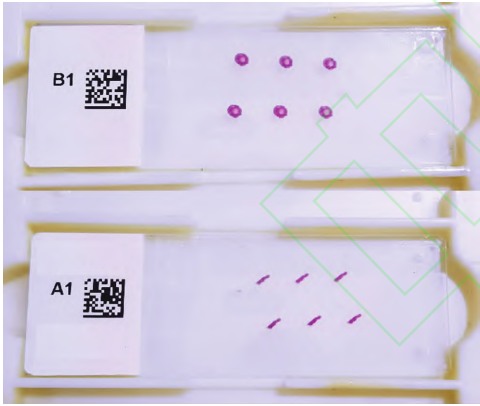


图5 消化内镜活检标本切片,每个蜡块切6~8个蜡片

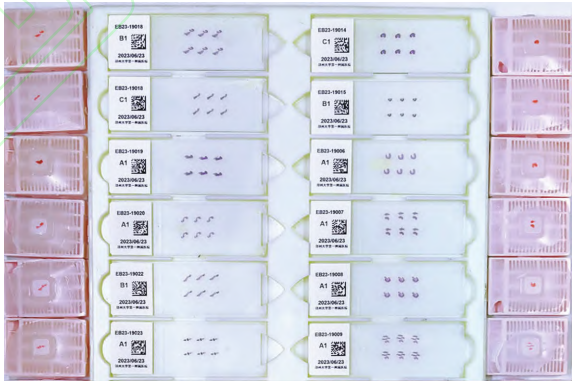


图6 消化内镜活检标本切片核对,先核对病理号是否吻合,再将蜡块翻转核对组织形状,最后确认切片完整性、收片是否规范及有无污染

2 000 张,或稀释 10 倍,延长染色时间并每天更换。脱水乙醇和透明二甲苯与切片数量及空气湿度密切相关,需根据科室实际情况进行更换。定期更换:每周切片总量少于 600 张,更换第一道脱蜡二甲苯和脱蜡 95% 乙醇,叠加数量要参照定量更换标准。

6 出片规范

将切片按顺序摆放于晾片板,蜡块病理号朝上置于切片旁边。先核对病理号是否吻合,再将蜡块翻转核对组织形状,最后确认切片完整性、收片是否规范及有无污染(图 6)。

7 质量控制规范

(1)包埋环节对取材质量进行评估,发现取材问题,应及时记录和反馈。(2)切片环节对包埋平整性、组织方向等进

行评估,存在问题及时记录和反馈。(3)性能验证:每次更换新配方染液(或新品牌染液)应进行性能验证并记录。(4)肉眼观察切片黏膜方向,若未竖埋或无法确定,应在镜下查看包埋方向;同时抽查切片质量、染色质量。优质切片要求:可见黏膜活检标本各层组织结构,组织切面完整,无皱褶、裂隙、颤痕、刀痕,无污染,厚薄均匀,红蓝对比度好,无气泡及溢胶,玻片病理号打印清晰。(5)对问题组织进行重包、重切或重染等相应处理,并作好记录。(6)定期召开质量会议,归纳和分析存在的问题,查找原因,提出整改意见,减少或避免类似事件再次发生。

参考文献:

[1] 王仰坤,姜波,李从洋,等.胃黏膜活检组织病理学诊断与随访复查分析[J].临床与实验病理学杂志,2018,34(2):137

- 142.

- [2] 张沐雨, 雨山, 焦宇飞. 我国肠黏膜活检中“癌”的病理诊断的现状和问题[J]. 中华病理学杂志, 2021, 50(9): 983 - 986.
- [3] 张松, 贺奇彬, 彭春艳, 等. 活检病理提示食管低级别上皮内瘤变发生内镜黏膜下剥离术后病理升级的危险因素分析[J]. 中华消化内镜杂志, 2016, 33(6): 357 - 361.
- [4] 李风, 项平, 欧阳琪, 等. 胃黏膜低级别上皮内瘤变及早期胃癌活检病理与术后病理差异的危险因素分析[J]. 中华消化内镜杂志, 2018, 35(5): 336 - 340.
- [5] 夏莉花. 内镜黏膜活检组织的病理诊断思路及陷阱[J]. 全科口腔医学电子杂志, 2019, 6(10): 145.
- [6] 刘朝晖, 李花林, 彭阳, 等. 胃黏膜活检标本规范化处理对活检阳性率的影响[J]. 现代消化及介入诊疗, 2020, 25(11): 1525 - 1527.
- [7] 中华医学会病理分会消化病理学组筹备组. 慢性胃炎及上皮性肿瘤胃黏膜活检病理诊断共识[J]. 中华病理学杂志, 2017, 46(5): 289 - 293.
- [8] 中华医学会消化内镜学分会病理学协作组. 中国消化内镜活组织检查与病理学检查规范专家共识(草案)[J]. 中华消化杂志, 2014, 34(9): 577 - 581.
- [9] 黄艳, 薛玲, 周炜洵, 等. 内镜活检炎症性肠病的诊断及鉴别诊断[J]. 中华炎症肠病杂志, 2020, 4(3): 270 - 275.
- [10] 徐金永, 赵夫娟, 陈阳. 胃肠黏膜腺脂囊式包埋与常规包埋对比分析[J]. 临床与实验病理学杂志, 2014, 30(4): 461 - 462.
- [11] 赵倩, 杨爱华, 苗向阳, 等. 提高胃镜下活检发现早期胃癌的准确性[J]. 精准医学杂志, 2021, 36(5): 460 - 463.
- [12] 刘婷婷, 杨宁江. 消化道内镜活检标本石蜡切片制作分析[J]. 中国继续医学教育, 2019, 11(31): 99 - 101.
- [13] 陈晓宇. 胃肠道活检和手术标本的病理检查要点[J]. 胃肠病学, 2012, 17(11): 641 - 645.
- [14] 国家卫生健康委员会. 食管癌诊疗规范(2018年版)[J]. 中华消化病与影像杂志(电子版), 2019, 9(4): 158 - 192.
- [15] 刘华斌. 浅谈病理科小活检标本制作方法[J]. 临床医药文献电子杂志, 2020, 7(44): 143 - 144.
- [16] 王渝, 何川, 倪凤明, 等. 胃肠道活检和内镜下黏膜切除术/内镜下黏膜剥离术标本规范化处理流程要点[J]. 中华病理学杂志, 2018, 47(11): 865 - 867.
- [17] 熊红梅, 卓小花, 邱晓明. 醇溶性和水溶性伊红在活检小组织标本预染上的应用比较[J]. 临床与实验病理学杂志, 2021, 37(5): 628 - 629.
- [18] 邓雪琴, 陈新妹, 郭寿铭, 等. 活检小标本预染处理探讨[J]. 诊断病理学杂志, 2022, 29(6): 555 - 556, 559.
- [19] 杨屹, 周林艳. 伊红染液在小组织标本组织处理预染色中的改良应用[J]. 临床与实验病理学杂志, 2020, 36(9): 1110 - 1111.
- [20] 丁伟. 组织发脆原因的探讨[C]//2013年第三届长三角地区病理技术新进展研讨会暨浙江省第八次病理技术会议论文汇编. 浙江大学附属第一医院, 2013: 83 - 85.
- [21] 金珠, 编著. 上消化道活检组织病理学彩色图谱[M]. 北京大学医学出版社, 2011: 1, 24, 109.
- [22] 丁伟, 王德田, 编著. 简明现代病理学技术[M]. 浙江科学技术出版社, 2014: 17 - 18.
- [23] 董芸蓉. 消化内镜活检组织石蜡 HE 制片的优化[J]. 现代实用医学, 2020, 32(11): 1372 - 1373, 1383, 1444.
- [24] 马恒辉, 周晓军. 组织切片常见问题与对策[J]. 临床与实验病理学杂志, 2009, 25(2): 211 - 214.

共识编写专家组成员(按单位名称汉语拼音字母顺序排序): 安徽医科大学第一附属医院(潘美华); 北京大学第三医院(张燕); 北京大学肿瘤医院(周立新); 福建省立医院(陈昕); 福建省肿瘤医院(师怡、吴在增); 福建医科大学附属第一医院(李国平); 复旦大学附属华山医院(高名士); 复旦大学附属中山医院(宿杰、阿克苏、黄洁); 复旦大学附属肿瘤医院(张静、周学科); 广东省人民医院(骆新兰); 广西医科大学第一附属医院(党裔武); 广西中医药大学第一附属医院(崔锦珠); 哈尔滨医科大学附属肿瘤医院(孟宏学); 海军军医大学附属长海医院(倪灿荣); 航天中心医院(侯芳); 河南省人民医院(孙廷谊); 湖北省肿瘤医院(王明伟); 华中科技大学同济医学院附属协和医院(罗丹菊、翁密霞); 江苏省人民医院(张炜明); 吉林大学第一医院(王渝); 空军军医大学西京医院(胡沛臻、钱守斌); 辽宁省肿瘤医院(何莲); 陆军军医大学大坪医院(毛成毅); 南京大学医学院附属鼓楼医院(吴鸿雁、杨军); 宁波病理诊断中心(陈洁); 宁夏医科大学总医院(秦璟); 宁夏医科大学肿瘤医院(李国富); 青岛大学口腔医学院(赵洁); 陕西省宝鸡市中心医院(徐燕); 陕西省肿瘤医院(王晓敏); 上海交通大学附属新华医院(虞文伟); 上海中医药大学附属岳阳医院(沈志红); 上海交通大学附属瑞金医院(许海敏); 山西省肿瘤医院(肖彦增); 首都医科大学附属北京世纪坛医院(高颖); 四川大学华西医院(雷松、陈敏); 苏州大学附属第一医院(朱卫东); 天津中心妇产科医院(宋剑婵); 温州医科大学附属第一医院(黄卡特); 无锡市第二人民医院(汤鸿); 西安交通大学第二附属医院(靳耀锋); 新疆石河子大学医学院第一附属医院(郑玉琴); 新疆医科大学第一附属医院(师艺、苗娜); 云南省第三人民医院(徐开军); 云南省肿瘤医院(陈芸); 浙江大学医学院附属第一医院(丁伟、姚洪田、邹尹影、徐黎明); 浙江大学医学院附属第二医院(王海军); 浙江大学医学院附属杭州市第一人民医院(王伟); 浙江省肿瘤医院(胡锦林、张谷); 郑州大学第一附属医院(高冬玲、黄培); 中国医学科学院/北京协和医学院/北京协和医院(王德田、薛晓伟、庞钧译); 中国人民解放军北部战区总医院(秦海明); 中国人民解放军东部战区总医院(马恒辉、王璇); 中国人民解放军总医院第四医学中心(康佳蕊); 中国人民解放军总医院第一医学中心(宋欣); 中国医学科学院肿瘤医院(郭蕾、郑波); 中南大学湘雅医学院附属湘雅医院(傅春燕); 中南大学湘雅医院(徐志杰); 中日友好医院(张红雷); 中山大学附属第一医院(梁英杰、董愉); 中山大学附属肿瘤医院(肖永波、卢佳斌); 重庆市人民医院(刘瑾)

本版共识执笔人: 黄培、姚洪田、薛晓伟

通讯作者: 高冬玲(E-mail: gaodlxq@126.com)、丁伟(E-mail: 13605815098@163.com)、傅春燕(E-mail: 1024113640@qq.com)