

獸醫病理學標準作業程序

Veterinary Pathological Standard Operation Procedures

林正忠

中興大學獸醫病理生物學研究所

中華民國獸醫病理學會

前言：

我國公務獸醫包括動物檢疫與防疫等行政架構與執行業務體系尚稱健全有關法令規章也都齊備；妥善運作應可發揮健全的檢疫防疫功能。然而近十多年，許多新的動物疾病不斷的在臺灣出現，一方面不斷引進種畜禽，帶入病源。另一方面如候鳥過境、國際旅遊均會帶入病源。

許多經濟動物各種疾病一再發生、無法根絕；與臺灣大型集約經營與飼養密度過高等等均有關係，社會經濟快速發展以及老齡人口不斷增加，伴侶、玩賞動物急增，飼養動物者社會責任觀念未養成，病畜丟棄街頭，國人信佛，反對撲殺流浪犬、貓，甚至在公園、校園定時定點餵飼流浪犬、貓，造成社會公害等等問題甚多。

不論經濟動物、伴侶玩賞、保育動物、疾病問題均需獸醫處理。各縣市家畜疾病防治所均已建制完成，基本設備與人員配置也都齊全。然而各縣市家畜疾病防治所主管單位為縣政府，各縣市情況不一，防治所硬體與人員配置有差異。防治所硬體設備大部分係由省與中央分年補助，設備差異也大。如何運用現有設備、人力資源使之發揮功能還須統一規劃辦理。

公務獸醫依法執行公務，在各縣市家畜疾病防治所，病理檢驗試為最基礎之必備作業單位。就如前述各縣市防治所人力配備與設備差異大，本計劃目的在研擬規劃一基本病理作業程序。適合各防治所使用，也希望統一各防治所動物病理檢驗的作業程序，方便資訊交流。將來電腦建檔與全省連線更可納入疫情的通報與掌控提昇畜疫防疫效率與水準。由於整套的作業程序範圍經費及資源龐大。擬分年分段辦理。

本標準操作程序由中華民國獸醫病理學會編輯，作業程序手冊主要係供本省各公務獸醫與防治所同仁使用。盡量考量各所之軟體設施、人力資源、工作特性、工作能量之差異；但研擬最基本的標準操作程序，呈請主管機關核可後頒行實施。

中華民國獸醫病理學會

第一章 建築與設備

前言：

各縣市家畜疾病防治所為其所轄區內，法定最高家畜防疫檢疫機構。檢驗處理病例為其職責。各防治所病畜禽疾病之檢測作業為絕對必須之基本功能。在規劃設計檢測作業設備上，有必要從疾病防疫角度多做考量。以避免病源散播。目前各防治所檢驗室部分尚可符合標準。唯獨屍體解剖房尚無一所符合規定。

各縣市家畜疾病防治所的屍體解剖房，經常要剖檢各種家畜禽傳染性疾病病例；很有可能要剖檢高污染高傳染性法定傳染病。在處理此類病例前後，必須採取嚴格消毒措施；整間解剖房內外、屍體與排泄污水必須經過消毒處理。因此各縣市家畜疾病防治所的屍體解剖房，應僅供屍體解剖檢驗採樣用；不得兼作倉庫、藥品或器材儲存間、病源分離培養室或車庫等用途。其排出之污水需先匯集處理後再排出。

解剖房內設備只准裝設解剖所需之設備，並於必要時各種器材、解剖檯、門窗、天花板均可耐強消毒作業之處理。

甲、解剖房

一 建築：

解剖房之建築，應為一獨立之建物；且與周邊之建物有一定距離之安全分隔區。而其污水處理系統應為獨立且能容許加藥與加熱處理。基本的固有設施如下（註：臨床微生物與病理切片區之可設置在別的建物中）：解剖檯、吊車、冷藏庫或冷凍櫃、焚化爐、廢水處理設備、照明（探照燈式水銀燈）、空氣及自動灑水消毒系統（可進行人員及車輛與設備之消毒槽）。

二 設備：

1.固定設備：

- 1.1 解剖設備—鋸帶機、圓盤骨鋸、秤等。
- 1.2 影像紀錄—照相台或組織翻拍台等。
- 1.3 標本收存—標本架、標本瓶等。

1.4 組織處理—組織軌道振盪機、組織修整檯等。

2.移動式設備與器械：

2.1 解剖刀械—刀、剪（骨剪及外科剪）、骨鋸、磨刀棒、鉗子等。

2.2 容器—組織瓶（罐）、拖盤、屍體袋等。

2.3 藥品—固定液及脫鈣液與消毒藥品等。

3.服裝：工作服（最好是連身式）、厚橡膠手套、雨鞋、防水圍裙；最好能戴外科用布帽。

三 解剖房之運作要求：

1. 人員動向— 其入口為更衣室，出口為浴室。進入解剖房一定換上解剖服裝（工作服、雨鞋及橡膠手套），自更衣室出口入解剖房。工作結束，人員出解剖房，應有基本之浴室設備於解剖後供淋浴與消毒。若限於空間則至少要有一消毒及換衣物之空間；且於出入時均需踩過小消毒水槽進行鞋底消毒。

2. 消毒— 除例行之每週全面清洗消毒之外；每次解剖工作結束，應立即以高壓水柱或刷洗清潔之。尤其距離稍遠之地面可能噴到血液或體液仍需以水柱沖洗。待地面與解剖檯半乾時再噴灑消毒劑。但消毒劑盡可能使用鹼片、鹵素與醛類製劑，如此方能殺滅病毒與細菌。解剖結核病動物時需使用煤油酚製劑消毒。若較危險之微生物性疾病可使用火焰消毒。兩性消毒劑、四級銨類、界面活性劑等細菌性消毒劑用於人員皮膚消毒。

3. 屍體處理及骨灰處理— 剖檢動物之屍體、臟器組織碎塊或血塊以較厚之塑膠袋盛裝並綁緊（可於袋上註明日期或病例號），再放入深塑膠桶中，可防止血水流出污染環境（尤其運送至焚化爐之過程中）。再送入冷藏庫或冷凍庫中定期焚化。骨灰處理亦以掩埋為原則且覆土至少三十公分。

4. 病材保存— 解剖時血液、糞材、尿液、腹水、皮毛刮取檢體、腦脊液之保存後送或前處理—血液、腦脊液、糞便、皮毛刮取檢體可先製成抹片並固定之；或先冷藏待剖檢完成再進行檢驗。而寄生蟲蟲體可保存於生理鹽水或以 10% 溫福馬林液固定之。而血清檢體則以針筒採血，且針筒退到底並斜放成斜面待血液凝固，並先冷藏待剖檢完成再回實驗室分離血清。

5. 組織塊及病材之編號－ 依農林廳之規定英文字母代碼。(序列應含台灣省及台北、高雄家畜衛生試驗所、全省各縣市家畜疾病防治所)。
6. 解剖病變記錄要領：剖檢程序見下一章
 - 6.1 基本病史－依各防治所有固定登記表，內含：動物種類、品種、年齡、性別、體重、疫苗使用、飼料、發生率、致死率、臨床症候、藥物使用、畜主地址、電話、傳真等。
 - 6.2 外觀檢查－含年齡、胖瘦程度、可視黏膜面、皮毛、天然孔、死亡時間判定等。
 - 6.3 皮下組織、乳腺、關節及淋巴結是否腫脹。
 - 6.4 胸、腹腔及心囊腔有無體液（量、顏色、氣味、黏稠度）附著物（顏色、形狀、黏附之臟器）。
 - 6.5 胸腔有無陰壓，心臟是否屍僵。
 - 6.6 腹腔、胸腔臟器有無異位（扭轉，絞窄 hernia 等）。
 - 6.7 各臟器之病變描述要領： a.大小 b.分佈 c.形狀 d.顏色 e.數量 f.軟硬 g.氣味。
 - 6.7.1 大小：最好以實際量測之尺寸以公制單位立體方式記錄。例如：3－5 mm半徑大小不一，約 5 cm直徑，2x5x6 mm等。亦可用實際物做比擬；如：針點大、綠豆大、雞蛋大、錢幣大等。
 - 6.7.2 分佈：在各臟器存在之位置如：解剖學位置、深淺層、多發、瀰漫、廣泛局限、單一、單側、單葉、對稱、擴散、穿出、凹下等。
 - 6.7.3 形狀：病變形狀依有無明顯界限為依據可分為：圓形（球形）、卵圓形、不整形、三角形、多角形、方形、菱形等。或針狀、線狀、球狀、筒狀、囊狀、星芒狀等。若有內容物則將內容物與囊壁加以形容（固體、液體、薄壁、厚壁等）。
 - 6.7.4 顏色：病變顏色描述可以近似色澤表示。例如：黃白色、黃色、正紅、棕色、斑駁綠褐色且帶金屬光澤。

6.7.5 數量：最好能確實算出數量，若過多則亦可用約略計算。
例如：約 30 個，6 個，50—80 個

6.7.6 軟硬：軟硬標準因人而異，但在病變則可清楚以組織之硬度（且在解剖時清晰可比）。例如：柔軟似脂肪（或肺）；觸感肝樣；觸感肉樣；硬實若骨樣硬；硬實程度不一，且肉樣，肝樣，骨樣均有。

6.7.7 氣味：若有分泌液或明顯之氣味或刺激性氣體，則記錄之。例如：腐敗臭，氨臭、甜味（酮症）或刺激酸味等。

以實例說明如下：可見肝臟右外葉表面及實質可見十個卵圓形、大小不一且約 0.1—5 cm 直徑，灰白色多發薄壁半透明水泡囊狀構造，其中最大之囊體內含物為黏稠狀黃褐色透明液體，約 10 ml。

乙、組織切片室

組織切片室之建築分為乾區（切片區）及濕區（染色區）兩大部分；固定設備有：

1. 乾區—切片機專用工作檯（呈 L 形且一定要很穩固，最好是木桌且固定於牆壁或水泥製工作檯）、藥品櫃。
2. 溼區—水槽、抽氣機、染色與封片用抽氣櫃。
3. 走道及石蠟塊與玻片保存區—鐵櫃或角鋼架。

一、機械設備：

1. 切片機 **Microtome**

- 1.1 石蠟切片機 — 迴轉式、滑走式（依各廠牌型號說明書使用）。
- 1.2 冷凍切片機 — 冷凍台式（簡易型）、冷凍室型。
- 1.3 超薄切片機 — 電子顯微鏡檢體用樹脂切片機。

2. 組織脫水機（或組織處理自動裝置）**Tissue Processor**

- 2.1 傳統式（浸潤迴轉式）
- 2.2 陽壓、負壓交替式（密閉式）
- 2.3 石蠟融缸

3.染色與封片 **Stainer**

- 3.1 手動操作染色抽氣櫃
- 3.2 密閉抽氣之自動染色機
- 3.3 染色液儲存櫃

4.組織包埋中心 **Embedding center**

- 4.1 儲蠟池
- 4.2 小型熱板
- 4.3 冷凝板

5.其他設備

- 5.1 冷水切片展開盆-
- 5.2 熱水切片展開盆
- 5.3 熱板
- 5.4 烘箱
- 5.5 模具清理脫臘設備
- 5.6 臘塊護臘缸及臘塊整理
- 5.7 切片盤、盒及整理櫃

二 組織切片室之設立要求：

1.操作動向：組織切片為一連貫系列且於數小時便可完工之程序。故其操作動向關係到操作之順手與效率。

1.1 乾區其一系列設備擺設如下：組織脫水機（或組織處理自動裝置）**Tissue Processor**、組織包埋中心 **Embedding center**、切片機 **Microtome**、冷水切片展開盆、熱水切片展開盆、熱板。至此乾區工作完成。將未染色之切片插至染色籃架中，拿到濕區染色。（組織包埋中心之冷凝區與冷水盆，一定須位於切片機之

左右側；如此工作才順手)。

1.2 濕區其一系列設備擺設如下：自動染色機（或抽氣櫃中放置系列染色缸）、抽氣櫃（封片區）、烘箱。

- 2.危險藥品管制：福馬林具腐蝕性，二甲苯及其他有機溶劑有致癌性。二甲苯與酒精均為易燃且具爆炸性要注意火源、二甲苯具有毒性，一定要於抽氣狀況下操作。其餘藥品最好放置於通風且陽光不直射的地點。
- 3.高溫及火焰之注意：切片製程中之溶劑與石蠟大都可燃，須與火源遠離適當距離。而且清潔或操作模具清理脫臘設備常需加溫，切不可因疏忽而導致煮沸過久，乾燒而導致火災。建議使用可定時之電磁爐、其安全性較高。
- 4.切片與蠟塊保存與檔案登記：一定要設登記簿，且依年度與動物種類（如家禽、家畜與水產等）分別登記保存。於切片櫃與蠟塊保存櫃外註記流水號以方便管理與建檔。而切片與蠟塊最好保存於較涼且乾燥的儲存室，以免切片發霉或退色與蠟塊受熱融合黏粘（尤其放在染色水槽附近更易發霉）。

丙 顯微鏡觀察室

一 建築配置：

最好有暗房，且就在切片室或切片檔案室附近。

二 設備：

- 1.顯微鏡：顯微鏡之種類及利用（含明視野與暗視野、位相差 Phase、干涉位相差 DIC、偏光 PL）：請參考各廠牌與型式之操作說明書；使用法於顯微攝影部分會作簡短說明。
- 2.照相系統：最好可與攝影系統及電視（監視器）互通與連線，方便病例討論。操作法見顯微攝影部分。
- 3.油鏡使用與清潔液：油鏡使用後應以拭鏡紙先拭（沾）去鏡油。使用棉花棒沾絕對酒精或 95% 酒精可同心圓繞圈輕拭乾淨鏡油。（拭鏡液亦可用乙醚：酒精＝7：3 混合液）。

4. 螢光顯微鏡：暗房觀察為基本設備要求，因應不同染劑、選用不同濾鏡。
5. 電腦設備：輸入病理報告用。病理切片之影像數位化，為將來必然之趨勢。則顯微鏡之高階攝影槍（CCD）、影像捕捉卡、高階個人電腦與輸出系統（彩色列表機、熱感應紙輸出機）、光碟燒錄機等。
6. 幻燈機與燈光箱：整理幻燈片用。

第二章 動物屍體解剖技術

Techniques in Gross Pathology

甲 前言：

動物屍體解剖又稱病理解剖，一般都是對死後的動物屍體進行各種檢驗，以取得動物生前所罹患疾病之病因、致病機制、病理變化、死因，以及生前疾病所呈現臨床症狀與結構上或功能上病理變化的關係。其所獲得資訊對該動物疾病診斷，醫療作業與效果之後續追蹤，彌足珍貴。為建立醫學知識的主要工具。

在食用動物方面當畜群發生疾病時，為快速有效瞭解病因或獲得病理診斷，經常選擇呈現具典型臨床症狀之病畜，經安樂死後，再進行屍體解剖與必要之醫學檢驗。以作為擬定畜群醫療措施（Herd Medicine）的依據。屍體解剖宜由專業病理工作人員執行。然而病理工作人員有限，許多剖檢工作不得不由現場獸醫辦理。本章的目的在研擬一套基本的動物屍體解剖作業程序，供獸醫病理人員共同採用，建立檔案，累積充實獸醫學與知識交流。

一個健全的疾病診療制度必定是建立在臨床與病理的充分配合的基礎上。也唯有堅強的病理診斷系統的確立，才能為臨床獸醫提供最佳的服務，使臨床診療有了科學的憑據，勝任整個疾病防治上的重任。

屍體解剖的重要目的既然是疾病的診斷，就必須選就一種不會忽略病變而能達到目的的方法。根據經驗下面介紹的屍體解剖術就是一種最簡單實際的方法。本剖檢技術曾經在好幾個美國獸醫學院的病理解剖房及研究室施行多年，適用於所有哺乳動物的病理解剖。剖檢人員熟悉本剖檢技術後養成良好的正確的剖檢習慣，解剖時能有系統的檢驗所有臟器的每一部分，就不會疏漏肉眼觀察到的病變。

乙、程序

一 問取病歷

詳細的病歷有助於疾病的正確診斷；病歷應包括發病動物的年齡、頭數、飼養管理條件、牧區環境、疾病免疫情況、臨床症狀、治療情形及死亡頭數。若有臨床病理檢驗資料（如血、尿、糞等檢驗）

也一併記錄。剖檢者應擅長於問取病歷，尤其對於未受過獸醫專業訓練的畜主，不能期待他們會主動而有條理地描述疫情、病歷；因此如何問取有價值的病歷是剖檢人員的責任。

剖檢前，剖檢者應詳讀病歷，若病畜由畜主直接送檢，則需向畜主問取病歷。

二 解剖前之準備工作及應注意事項：

- 1.解剖器械之準備：解剖器械應求簡單而可完成完全解剖即可。解剖刀、鋸子、磨刀鋼條、外科剪刀及骨剪各一把是最起碼之需用器械。為蒐集標本行組織切片，必須準備裝有 10% 中性福馬林液之廣口塑膠瓶，而乾淨之玻片於抹片製作時使用。
- 2.剖檢者應著解剖工作服（附加圍兜更佳），穿長統膠鞋及戴解剖專用之粗面橡膠手套。
- 3.解剖台應先潑水使台面潮濕，以防止血液及其他液體之粘著。長毛動物也需潑水潤濕毛髮，以免毛髮飄浮散落。所有哺乳動物均以左側臥式剖檢。剖檢者面向其腹面。專一不變之剖檢法，可以養成習慣性之操作，使技術臻於熟練也有利於發現器官異位及記憶對稱性器官病變。
- 4.若和田間操作應儘可能避免污染環境散播病原。也必須考慮到善後處理屍體及環境之消毒問題。
- 5.詳細閱讀病歷以供解剖時之參考資料。剖檢時應特別注意與臨床徵候有關之器官病變。
- 6.需要做其他特殊檢查如微生物及生化學檢驗，可由有關人員或剖檢人員先採標本化驗病材，然後再進行病理解剖。對於專題研究之實驗動物，實驗材料應儘可能在剖檢前採取。解剖時研究人員最好親自或指定專人會同剖檢，或書面註明特別事項及需要特別觀察之臟器。
- 7.組織採樣，其厚度不要超過 0.6 公分，固定液亦應至少二十倍於所採組織，以避免組織固定不全影響組織學診斷。採樣供組織切片檢查腦、肝、腎、肺外及所有有病變之組織，特別是當肉眼無法檢出有意義病變時應採取腦、肝、肺及腎臟組織行切片檢查。切割組織應使用銳刀，勿用剪刀以避免壓擠而損害組織。自病變部採樣，邊緣應含少部分正常組織。

- 8.每一解剖例應編有一個解剖號碼，使用不會溶解或褪色之標籤置於標本瓶內與標本瓶外。特別提醒，勿將解剖號碼標示於瓶蓋上，以免混淆病例，造成誤診。

三 動物安死術：

為了人道立場，活的病畜於解剖前應施行安死術。安死術方法很多，以靜脈注射麻醉劑及電擊法為常用；又以電擊法為方便，且有利於病材之病源分離。

電擊的工具是普通電線；一端裝上電插頭以便插入一般 110 伏特之插座，電線之另一端則分離陰陽兩線，各在其頂端裝置導電良好的金屬夾子。施行電擊時宜先將動物淋溼，再將裝有金屬夾子之陰陽兩電線分別夾住口唇及肛門，再把另一端之插頭插入插座，立即可以把動物電昏死。應用電擊法應注意安全，不可赤足立於潮濕地面，也不可在人未離開動物前放電，以免觸電造成意外。用銅夾子夾住口唇及肛門需牢牢夾住粘膜面，以免脫落造成動物驚恐、騷擾之意外。

動物電昏死後，立即剖檢，此時血液尚未凝固，心臟尚能跳動，自右下腋切開動脈，可依賴心臟將血液盡量排出，減少體內血液量，使病變更明顯與避免剖檢時血液流出掩蓋臟器。

四、解剖方法與步驟

1. 外觀檢查：

包括動物之營養與脫水狀態、可視粘膜、體孔及體表病變，也應注意外寄生蟲。

2.體內部檢查：

以下敘述之剖檢步驟及方法，可依情況而省略幾個步驟；但初學者為熟練技術應多做完全解剖。

2.1.自右腋下刺入開口第一刀，往頭部沿中線（稍偏右）直開到下巴，然後向尾部直開到會陰部（由右側繞過乳房及外性器官）。為避免弄鈍解剖刀，唯一與表皮接觸的是開口的第一刀；爾後刀由創口之內向外切，順著皮下組織而切開皮膚，切開皮膚後檢視頸靜脈。

2.2.向右翻開皮膚，切斷肩胛肌及解離右髖關節，使右側兩肢外翻。翻開乳房（雄性動物則切開陰囊鞘分離左右睪丸）並使中線部皮膚翻開到稍偏左（下）方。

2.2.1 檢視乳房：將各個乳房縱切一刀，再橫切數刀。

2.2.2 檢視淋巴結、神經及重要血管。

2.3. 打開腹腔：沿著最後肋骨（肋骨弓）切開腹壁到背部腰窩，穿過骨盤緣，向下翻開覆蓋面（腹肌）使露出腹腔。切開腹壁時必須注意勿傷及內臟（提升腹肌開口）。

檢視腹腔內之滲出物及器官位置。

2.4. 打開胸腔：刺破近肋骨處之橫膈膜（注意胸腔內之氣體湧入，若無氣體湧入則表示肺無塌陷或肺炎等病變），再沿肋骨弓切開右邊橫膈膜。注意胸腔內之滲出物（液）。用骨剪剪斷肋骨露出右胸；先剪近胸骨處之肋骨，再平剪離脊椎約數公分處之肋骨，便可移去右側肋骨。

2.4.1 檢視胸腔所有臟器之位置及表面病變。

2.4.2 檢視肋骨：先觀察肋骨面，再從移出之整排肋骨，取下一根中央部之肋骨。幼畜則用刀削開肋軟骨結合處，檢視切面之後，再反折肋骨彎弧並折斷之以側其強度。

2.4.3 原處切開心包膜檢視心囊腔。

2.5. 將消化道另作排列，使各部分均能露出利於檢視。

將肝臟前翻，露出膽囊，擠壓膽囊；正常情況可看到膽汁經膽管流入十二指腸。

捏緊胃賁門部切斷食道，把脾連同胃腸拉出。切下近肛門處直腸，把全部摘除之消化道置於一旁留待最後檢查。脾則先檢視之再橫切數刀。

2.6. 移去肝臟，把橫膈膜留在原處。檢視膽囊先擠壓以觀膽汁之流出，再切開囊壁以觀察粘膜、檢查肝臟每葉需做數刀切面。

2.7. 檢查腎上腺：數刀橫切腎上腺，注意其皮質—髓質—皮質之比例。

2.8. 分別移去腎臟，先右後左。不要切斷輸尿道，留著為腎與膀胱之固定線。

2.8.1 檢查腎臟：縱切腎直到腎盂部，剝開被膜。檢視表面及切面。（若採標本切片，須注意應包括腎皮質，髓質及腎盂上皮三部分）。

2.8.2 檢查輸尿管：刀子由腎盂部進入輸尿管直開通輸尿管。不必切離膀胱。

- 2.9.打開骨盤：用骨剪從兩側之閉鎖孔剪開恥骨與坐骨，取去恥骨縫合。把生殖及泌尿器官連同直腸末端提離體腔。
- 2.9.1 打開及檢視膀胱及尿道。
 - 2.9.2 先縱切再橫切兩側之卵巢數刀。
 - 2.9.3 打開子宮角、子宮體、子宮頸及陰道。
- 2.10.由下巴中線沿兩側下頷骨切開內邊肌肉拿出舌頭，並拉向下後方。切斷兩邊舌骨突起部軟骨。把舌頭連同頸，胸部器官一起拉向後方直到分離肺臟；在橫隔膜處切斷大動脈。
- 2.10.1 檢查舌頭：橫切數刀（特別注意舌尖切面）。
 - 2.10.2 檢查甲狀腺：切開並觀察副甲狀腺（豬之副甲狀腺包在胸腺前葉內側，呈粉紅色）。
 - 2.10.3 劃開整段食道。把食道及大動脈分離背尾部縱膈直到氣管分歧部。
 - 2.10.4 檢查氣管及肺臟：劃開氣管直下左右各主要支氣管，並觀察各切端之肺動脈是否有栓塞。檢查肺臟須觸診以明其硬度。切開各支氣管淋巴結及縱膈淋巴結。
- 2.11. 心臟開法
- 2.11.1 打開右心：左手握心讓右心向上朝向自己。第一刀由肺動脈平行並緊靠左冠狀縱溝直下右心室下端。打開肺動脈直上分歧部並檢視肺動脈瓣。翻轉心臟使左心向上朝向自己，由先前之下切端與右冠狀縱溝平行直開到右心房，並打開上下腔靜脈。檢視三尖瓣、卵圓孔及冠狀竇。
 - 2.11.2 打開左心：面向左心由正中縱切開左心房室。檢視二尖瓣及肺靜脈。把刀子插入二尖瓣膜下，順著大動脈入口切開心壁再直入大動脈以劃開大動脈。檢查大動脈半月瓣，左右冠狀動脈、頭肱動脈開口。縱切心肌數刀。此時附帶打開腹腔大動脈及其主要分枝（如腸系及腸骨動脈等）。
- 2.12. 檢查關節：五個關節（幼獸六個關節）是在常規檢查範圍內。即右髖關節，兩側後膝關節，右踝關節、右肩關節及枕骨與第一頸椎聯合。若有需要其他部位關節亦應檢查之。
- 2.12.1 後膝關節之開法：翻開皮膚，彎曲後肢，切開離脛骨結節上方約 1/3 處之膝蓋韌帶。再沿滑車中緣切開即可打開關節露出膝蓋骨。
 - 2.12.2 右踝關節之開法（幼獸多開一個左踝關節），切開後小腿皮膚，正切脛跗關節。

- 2.13. 移去頭顱方法：先剝去大部分頭皮、切斷雙耳（此時可檢視聽道），但在眼眶周圍留些皮膚。割去枕骨與第一頸椎聯合（關節）周圍軟組織，先鬆動頭部找出關節之正確位置（此時若需要可採腦脊髓液。），把刀子嵌入後頭孔切斷脊髓和關節背腹側之韌帶移去頭顱。注意勿把刀插入腦入腦實質。
- 2.14. 移去眼睛：用最小之牽力緊抓留在眼周圍之皮膚，切開眼眶周圍之韌帶軟組織。再把刀子緊貼骨頭深入眼窩內切斷視神經，即可移去眼球。要固定眼球前需先摘除多餘之周圍軟組織。
- 2.15. 腦摘除法：移去腦上頭蓋部多餘之肌肉，左手姆指與中指各抓住眼窩固定頭顱，食指在鋸刀上端以防鋸齒跳動。橫鋸前頭骨後端止於上眼眶隆突。再把頭顱右傾，以左手固定於左眼窩與下頷骨，由左枕頭髁中線平行向前斜鋸與第一次鋸線會合。再移動頭顱使左傾，頭顱前端向剖檢者，手指固定下頷骨與右眼窩，如前斜鋸。撬開頭蓋骨連同硬腦膜移去（小腦幕也需同硬腦膜一併移去），垂直地舉起頭，輕碰桌面使腦鬆離、切斷嗅神經幹及其他腦神經，傾斜頭端，使腦緊貼於桌面並分離取下。
- 2.16. 腦之檢查及採取標本：若擬做微生物檢查則移去頭蓋骨後。直接經由軟腦膜或切開腦膜採樣或分開腦半球（包括小腦及腦幹），一半供微生物檢索用途，另半則全部置入固定液中；若不做微生物檢驗則全腦在中央橫切數刀（但勿切斷）再固定之。
- 2.17. 移去腦下垂體：從枕骨髁間之枕骨底上割除一長條硬腦膜連同腦下垂體（使腦下垂體依附於硬腦膜上）摘除之。橫切腦下垂體。
- 2.18. 檢視口腔及咽喉部：割除下頷骨之間及兩側之肌肉。切斷翼頷間摺，用力拉離下頷檢視喉頭憩室及其他包括：鼻咽、聽管咽頭入口及聽管溝等部位。
- 2.19. 檢視鼻腔：豬行鼻道橫鋸法（由前臼齒前端橫鋸），以檢視左右鼻腔及中膈。若有帶鋸則把頭顱由中央縱鋸（注意避免鋸到門牙以免傷及鋸刀）使露出內斜面，以檢視鼻腔及副鼻竇。

- 2.20. 檢視胃腸道：把整段胃腸彎曲繞行置於地上。沿胃大彎部切開，並在十二指腸，空腸及迴腸各切開幾段代表性部位，打開迴盲及盲腸（必要時則需整段檢視）。

五、解剖記錄描述要點

描述病變應客觀精確，確免直接應用病理學名詞。每一病變均依大小，形狀，色澤，數目，硬度及位置六個要點以描述病變。病變在器官之分佈情形要儘量利用解剖學位置關係並以局部、局限蔓延、彌漫等用語記述；必要時可以畫圖補充說明。總之，剖檢記錄必須真實易懂，讓人讀之有如親臨剖檢之真實感為最佳。做屍體解剖而不寫解剖報告將無法留下剖檢資料，所有得到的標本也將因無資料可考而成廢物，對於個人以及社會都是損失。

病理解剖報告之病變描述應注意事項如下：

1. 部位：病變與其他器官之關係及其正常之位置。
2. 大小：採用公制（公尺、公分）。
3. 重量：採用公制（公斤、公克）。
4. 顏色：色調、色度及顏色之分布，要用正確的字句說明，如晦暗、綠煌、蒼白、紋斑、條狀、斑點。
5. 硬度與結構：觸診與觀察，如堅硬、強韌、堅實、凹陷、脆、軟、膠性、粘液樣、乾、濃厚、乾酪樣、線狀、粘連、顆粒、易曲、易碎等。
6. 味：組織及中空器官內的容物，其臭味是否顯著。
7. 各器官表面所見：如肝、脾、腎等、多毛、潰瘍、佈滿滲出物、光滑、不平、腐蝕、粗糙、凹陷、凸起、鱗狀、幽暗、皺狀、波動。
8. 形態：正常或異常。卵圓形、球形、圓錐形、橢圓形、三角形、扁平、結節、分葉、彎曲、盤形、點狀、杯狀、楔形、紡形、絲狀、花邊樣、螺紋狀、蕈狀、傘狀、圓頂狀。
9. 內容物：量與性質。
10. 管狀器官之腔道：管道狹窄或其他不正常。如開放、擴大、

阻塞、閉塞、狹窄、轉彎、分支、相通、彎曲。

註：最好將病變以相機做影像記錄；且將外觀與打開胸腹腔之視野拍照；在依次以檢查順序做攝影記錄。

六、病理標本收集注意事項

1. 病理標本送驗，應附送病歷及解剖記錄，每一病例編一個號碼及一份病歷與檢驗記錄。
2. 病理標本採要選取具有代表性者。
3. 病畜死後解剖，要儘早為之，避免畜體發生死後變化。
(Post-mortem change) 擾亂診斷。
4. 病理標本，除特別情形外，普通均用 10% formalin 固定（即市售 37~40% formalin 1:9 的水溶液，並非溶液內含純 formaldehyde 10%），固定好之標本久存不變，可隨時寄送，所採供組織檢查之標本不宜過厚，普通以半公分即可，以便固定液很快滲入組織，固定液之數量約為標本體積之 20 倍，固定時間 24 小時至 48 小時。註（1）
5. 腫瘍之採集：如有腫瘍需作組織檢查時，要在該腫瘍不同處採集 2 至 3 片，固定後送檢。
6. 公畜睪丸要先縱剖然後再橫切各部，詳細檢查有無炎症、鈣化、纖維化及腫瘍等病變。採樣時要由睪丸之前、中、後 3 個部位採取，固定於 Bouin's 固定液經 24 小時後組織硬化後，修整組織，擬做組織切片之修整組織片在置入新鮮 Bouin's 固定液 4-8 小時。傾去固定液，加以 70% 的酒精保存送檢。Bouin's 固定液配方：苦味酸 (Picric acid) 飽和液 (1.28%) 750ml，40% 福馬林 (formalin) 250ml，醋酸 (acetic acid) 50ml
7. 腦標本，將腦取出後，即浸於 40% formalin 中然後加水，使腦浮於固定液中而不露出液面為止，充分固定後，切大腦額葉前半部、視丘部、小腦、延腦、腦橋各一片送檢。
8. 遇有先天性畸形（如心臟、生殖器官等）、腫瘍、水腦、水腎等特殊標本時，應將整個器官或病變部固定保留，以供教學研究用。
9. 死產流產，病例需檢查時，應將全部胎兒及胎衣冰凍送檢，並

附母畜病歷卡。

10. 重要之病理變化，應予攝影保存。
11. 如遇重要病例，解剖後無法即予診斷者，則可將每一個重要器官如肝、脾、扁桃腺、肝淋巴腺、肺、腦等各採一片固定後送檢。
12. 為使組織不會過硬與染色效果良好，病材要儘速送檢，最好不要超過一週。
13. 常用固定液之中英配方及用途。

(1) 緩衝中性蟻醛液

37~40%蟻醛液	100.0 c.c.
蒸餾水	900.0 c.c.
磷酸二氫一鈉 (1 結晶水)	4.0 公分
無水磷酸氫二鈉	6.5 公分

這是目前最好而中外普遍使用的一種固定液。

Biffered Neutral Formalin Solution

37~40% formalin	100.0ml
Distilled Water	900.0ml
Sodium phosphate monobasic ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	4.0gm
Sodium phosphate dibasic (Na_2HPO_4)	6.5gm

(2) 醋酸鈉蟻醛液

37~40%蟻醛液	100.0c.c.
醋酸鈉	20.0gm
自來水	900.0c.c.

此為病材標本保存的固定液。

Formalin-Sodium Acetate Solution

37~40% formalin	100.0ml
Sodium acetate	20.0gm
Tap water	900.0ml

(3) 蟻醛鈣液

氯化鈣	1.0 gm
37~40%蟻醛液	10.0c.c.
蒸餾水	90.0c.c.

此為特別使用於脂類組織研究之固定液。

Formol-Calcium Solution

Calcium chloride, anhydrous	1.0gm
37~40% formalin	10.0ml
Distilled water	90.0ml

14. 經固定採樣後之組織，若擬作長期保存，需將固定液福馬林濃度自 10% 降為 2% ；必要時加 1% Phenol 密封，以防止固定液蒸發與發霉。

註：供組織病理檢驗之組織，採樣後（包括生檢，外科手術與剖檢取樣）放入含固定液之廣口瓶，更換一次固定液再將標本瓶置於軌道式震盪機上，低速震盪 24-48 小時，可使組織獲得適當的固定。組織修整後，必要時可再以新鮮固定液在固定 4-8 小時。

第三章 組織修整

一 目的：將已固定或已硬化組織，修整成為適合交由技術員進行製作組織切片前的處理作業。

二 組織來源：

可大致分為三種：

1. Biopsy 組織、 Bone marrow aspiration 及其他微細零星檢查。
2. Surgical specimen (外科檢體)
3. Autopsy specimen (剖檢檢體)

三 修整方式：

1. 2-1 及 2-2 一般係由臨床醫師送檢，由病理醫師簡單整理成適合切片作業檢體即可。
2. 剖檢病材應由屍體解剖者修整，以配合剖檢時所發現病變及採樣做適當修整，已便呈現或檢驗病材之病變。
3. 修整前處理：自固定液中取出之組織可先水洗 2-3 次，減少組織所含固定液，以方便修整。
4. 病變部位、採樣檢體與修整之組織，必要時均可以置標示輔助說明。
5. 組織在固定過程中，組織會先硬化，再逐漸固定成熟。已硬化之組織可以進行修整。修整後，再放回固定液中進行固定。組織必須完全固定成熟，才能進行脫水、包埋與切片製作的作業。

三 組織修整技術：

1.組織於固定液中需固定完全，固定完全與否決定因素包括：

- 1.1 組織之體積（或厚度）。
- 1.2 固定液之種類。
- 1.3 固定時間。
- 1.4 是否震盪或換液。
- 1.5 組織是否全面與固定液接觸（如漂浮之組織及貼於罐壁之組

織，其固定效果必定不良)。

2.組織修整之要領：

2.1 器械：

2.1.1 以實驗室切片機使用過之剃刀式切片刀已能完全勝任，但請注意刀刃之位置，不可拿反否則極易割傷手指。另外，選擇市售薄刃鋼質光面水果刀效果甚佳；或類似器材（筆者曾用過生魚片刀）均可。但必須經常維持刀刃平整銳利。

2.1.2 以包埋用石腊（最好是包埋機中略污損，但不含二甲苯之廢腊）製成規板。操作時最好戴外科手套操作，可避免皮膚受福馬林之傷害。

2.1.3 操作環境宜於通風良好且光線充足之環境下。若能使用組織修整台是最好，因有光線照明且有抽氣裝置與活性炭過濾設備。

2.2 技術：

2.2.1 修組織時刀刃與組織接觸，並與規板以 45- 60 度角度拉（或推）過組織。絕對不要以往復式來回鋸切的方式修組織，因為會使組織產生鋸痕，使製做切片時，需多做粗修之動作而減低刀片之壽命。

2.2.2 不可以大力向下裁切方式截斷組織，如此會造成如同剪刀剪組織般之過度擠壓，形成人為破壞。

2.2.3 整修下之組織最好不超過實驗室中最大蓋玻片之大小（一般最大者為 24×50 mm）。否則組織切下後無法完全封蓋。而厚度以不超過 3 mm 為原則；若太厚則組織於脫水、浸潤過程中無法達到良好效果。另外目前大部分國內獸醫病理研究室多已使用市售包埋匣（embedding cassette；或組織小盒），修整完成之組織以能平整不彎曲的放入匣中，即為常用正確之組織樣品面積。若組織過小，則需使用包埋匣孔洞較小者，或以濾紙或泡棉包裝組織再放入匣中。

2.2.4 原則上，應以一片組織、一個匣子、黏附在一張玻片為最理想之切片；但為了節省成本可將數個組織合併於一個包埋匣中。但須注意一個要領：需將組織硬度相近之組織放於同

一匣中，例如：肝、脾組織硬度相近；皮膚、肌腱相近；心臟、肌肉相近；肺、淋巴結、睪丸與腎臟大致相近；尚可一起放於同一匣中；但需注意避免組織大小差異過大，造成包埋時不易壓在同一平面中。脫鈣後之骨骼、腦、消化道、生殖道應獨立放於匣中，因組織硬度不同。

2.2.5 整修之組織塊，必須方正平整，宜就已固定定型之檢體整修。不可將已固定之組織（比如腸、子宮等管腔組織）以人為方式伸展後再整修。因人為伸展整修之組織塊放入包埋匣時會恢復扭曲，不易包埋。（採樣時，即應使組織攤平或在固定前以濾紙濡附或以針展開攤平再慢慢浸入固定液中平整定型，以利組織整修與病變的表達）。

2.2.6 實質器官（肝、腎、腦等）檢體厚度以 3 mm 為原則，管腔檢體可酌量加厚。教學或特殊用途組織：同一組織塊如需製作 20 片切片以上者，組織塊可增厚，但製作包埋過程中必須延長各步驟時間。

2.2.7 切取病變切面應遵守之通則：

- a. 組織有黏膜面與漿膜面者或皮質、髓質者；須於同一切面展現（例如：生殖泌尿道與消化道作橫切）。
- b. 正常區與病變之交界面。
- c. 表面有附著物不可剝除。
- d. 不同臟器橫切、縱切有其特定意義（例如：肌肉橫切以比較肌纖維直徑，而縱切要表現肌細胞中之橫紋）。
- e. 盡量不斜切。

第四章 脫水處理與組織包埋法

一 前言與原理：

例行診斷用組織病理切片，除非另有特殊目的，一般均以石臘為包埋介質。其目的在於使被切之組織，於室溫下為硬固之易切介質所全面取代。為達到此目的，我們一般均使用組織自動處理機來處理組織；而過程有三項：1. 脫水 2. 透明 3. 浸潤。

脫水處理的基本原理為水可溶於酒精中，酒精可與二甲苯互溶。而石臘又可溶於二甲苯中。因此將已固定成熟並整修成薄片的組織片塊浸於酒精中，並逐漸提高酒精濃度，使組織中的水分為酒精所取代。此項步驟稱為『脫水』。

已脫水的組織片塊再浸泡於二甲苯中，經過數次後，已脫水組織內所含酒精又被二甲苯所取代。完全被二甲苯所取代之組織片塊呈透明狀，將透明化之組織片塊浸於高溫融化的石臘液中，藉著石臘溶於二甲苯，而將石臘帶入組織內，再將完全浸透石臘的組織片塊置入包埋匣並灌注石臘，冷卻後形成組織石臘包埋塊。適合組織切片的製作。

經過上述三項過程，則組織內之水分全部為石臘（熔點較高之石臘）所取代；形成組織石臘包埋塊。適合組織切片的製作。茲再分段敘述之。以下是三個過程的原理：

1. 脫水（**Dehydration**）：將組織中的水分藉漸進上升濃度之酒精來取代，最終會使絕對酒精置換所有水分（若水分未能完全取代：如絕對酒精之濃度不足，則二甲苯及石臘將無法順利進入組織與細胞中，將導致切片中有小洞之情形或切片困難）。
2. 透明（**Clearing**）：二甲苯或其他有機溶劑（只要能與非極性分子之石臘互溶者均可作為透明溶劑使用）可使組織透明化且不明顯改變組織之形態；但會將脂溶性成份溶解帶走。目前最常用者為二甲苯，但其為揮發性具爆炸性且有毒之有機溶劑；市面上已有多種毒性及危險性低之透明劑供選擇。
3. 浸潤（**Infiltration**）：將熱融態之石臘取代二甲苯謂之浸潤。經數次更新石臘則使組織及細胞中完全被石臘所置換（不同熔點之石臘由切片人員操作順利與否來調控配合使用；一般最終大多為 58 - 63 °C 之硬石臘做為台灣地區腊塊之硬度）。市售組織包埋用石

蠟，均含有合成材料，以增加對組織的浸潤，及組織蠟塊之均勻與穩定；蠟塊易切也易保存。

二 組織自動處理機（Tissue Processor）操作原則與配方步驟：

由上述原理可知：組織處理之原理其實就是將組織中的極性分子－水置換為非極性分子的石蠟，而石蠟在常溫下為硬度適中，易於切成薄片之介質。故自動處理機之機械原理便是將組織序列地浸漬於不同種類與濃度溶劑中（包括熔融之石蠟）。而加熱、加壓、真空、攪拌等動作均可加速或加強置換之功效。

1.操作：以下為中興獸醫系病理室之二套系統做範例說明。

系統一：傳統式連續圓形前進式（自轉公轉式）

1.1.1 將整修後且浸於固定液之組織匣以流水充分浸洗，以除去福馬林（一般為 30－60 分鐘）。將組織匣承裝於組織籃中，掛上機器。

1.1.2 組織籃於機器掛鉤上，以順時針及逆時針方式於溶液缸中自轉，且掛鉤亦可上下移動。當設定時間到，掛鉤將上舉且移往下一溶液缸。此為公轉自轉式以增加浸潤效果。

1.1.3 建議程序與時間設定如下：酒精脫水、二甲苯透明化、熔融石蠟浸潤：

站	溶液	時間（小時）	備註（室溫操作）
1	60% 酒精	1	下午五點開始
2	80% 酒精	1.5	
3	90% 酒精	1.5	
4	95% 酒精	1.5	
5	95% 酒精	1.5	
6	100% 酒精	1.5	
7	100% 酒精	2	
8	二甲苯	1.5	
9	二甲苯	1	
10	二甲苯	1	
11	石蠟	1	熔點 57-60°C（蠟缸 62°C）隔日早上八點結束
12	石蠟	1	

系統二：陰壓陽壓交替式（溶液引入式）

1.2.1 原體同系統一，但組織籃不動，機器將溶液吸引入加熱密封缸中。操作時則施以陽壓與陰壓與微加熱，可增加浸潤效果。

1.2.2 建議程序與時間設定如下：

站	溶液	時間（小時）	備註（攪動及陽壓陰壓交替）
1	60% 酒精	1	下午七點半開始計時（45°C）
2	80% 酒精	1	45°C
3	95% 酒精	1	45°C
4	95% 酒精	1	45°C
5	100% 酒精	1	45°C
6	100% 酒精	1	45°C
7	100% 酒精	1	45°C
8	二甲苯	1	45°C
9	二甲苯	1	45°C
10	二甲苯	1	45°C
11	石蠟	0.5	蠟熔點 57-60°C
12	石蠟	0.5	（蠟缸 63°C）
13	石蠟	0.5	隔日早上八點結束
14	石蠟	0.5	

2.注意事項：

2.1 組織必須完全固定成熟，才能進行脫水與包埋。

2.2 整修後組織片塊越厚，則脫水與包埋處理之每一步驟需要更長時間才能完成。

2.3 組織片塊太薄，在處理過程中容易變形。

2.4 組織片塊在高濃度酒精、二甲苯與高溫石蜡液中，時間越久，組織皺縮越嚴重，組織片塊會變硬變脆，將來包埋成塊後，製作組織切片時，組織硬度高於包埋之石蜡不好切、組織易碎。鏡檢時，組織嚴重變形。

第五章 組織切片技術

甲 石臘塊切片法(Paraffin Block Section)

一 前言：

切片工作在組織標本製作過程中，是極為重要的一環。前面所述製作石臘塊的各步驟及其操作方法是否正確？例如：組織片中石臘是否充分浸入，藥品品質的好壞，切片刀的鈍利，切片機的性能以及技術人員的切片技巧等，皆影響切片標本的品質至鉅。關於切片的技巧，這裏僅提供一些原則，因為技巧方面，不容易用文字來描述。最好的辦法是多請教前輩富有經驗者指點，再自己勤加練習，領悟其中要訣，自然熟能生巧。有了優秀技術再配合好儀器與對儀器性能之了解，則對切片工作，即能駕輕就熟。

二 切片機 (microtome)

切片機大致可分為滑動式(Sliding)及迴轉式(Rotary)兩種，各式雖有多種不同廠牌，但其構造及性能大致相似。

1. 滑動式：為二次大戰以前所製造之樣式，迄今無多大改變，多用於單片切片。主要構造有石臘塊及切片刀之固定座。滑動切片機切片操作其優點計有：
 - 1.1. 石臘塊大小限制較少。
 - 1.2. 石臘塊在固定座上換取方便、快速，適於工作量大的實驗室，猶可節省工作人員。
 - 1.3. 組織塊在固定座上視野廣闊清楚，因之容易調整角度，輕易切取理想切片。
 - 1.4. 包埋不理想的石臘塊，憑藉施展技巧即可切取切片。

滑動式切片機之使用，如欲達到得心應手的境界，必須勤加練習。現今台灣各大醫院病理科實驗室皆以滑動式切片機為主。日本使用此種切片機之病理學科據謂高達 85% 以上。但獸醫之病理研究室則以迴轉式為主。

2. 迴轉式：可作連續切片，易學乃其利點，但因石臘塊大小有限制，換取石臘塊較費時間（但目前已有快速換裝夾頭，已大為改善），故操作較滑動式為不便。工作量較大的實驗室，雖不適合，如僅供學生實習及件數較少醫院及家畜疾病防治所使用，則較合適。

此種切片機之主要構造，備有石臘塊及切片刀固定座，切片時利用石臘塊上下移動行之。

二 磨刀法與剃刀刀片：

1. 磨刀：從前利用上好磨石，先磨切片刀，再以軟硬不同層面之皮革(或平滑木板)塗以泥劑(微粒粗細不同，計有 1 至 4 號)研磨之，很花費時間。如今大都以剃刀刀片替代鋼刀了。
2. 剃刀刀片：現在已有一種剃換刀片（分寬刀和窄刀兩種）出售，使用後即丟棄，非常方便。刀片非常銳利，對較硬的組織亦可輕易薄切，一片刀片在人醫院大致可切石臘塊 60 個左右；但獸醫病理病例因硬度差異大，則只約 10---20 個，目前台灣獸醫界已有普遍使用這種刀片。

三 薄切方法：

1. 滑動式切片機

- 1.1 以石蠟油(Liquid paraffin)潤滑切片機的軌道。
- 1.2 將經過冰凍冷卻的石臘塊，固定於固定座上，調整位置並加緊轉鈕。
- 1.3 利用高低上下左右調整鈕及眼睛判斷，將石臘塊調整而使之與軌道平行。
- 1.4 將切片刀固定於刀架上，使與軌道成約 45 度角，調整刀面與石臘塊成約 30°角左右。
- 1.5 調整固定座上下調整鈕，使石臘塊平面與刀鋒面接觸，準備切片。
- 1.6 前後推拉刀架，粗削石臘面，直到最大組織面出現為止。
- 1.7 繼續轉動微調(2—8Microns)固定座推進器薄切之，隨時以小紙沾水，沾取切片，置於冷水槽水面。
- 1.8 將水面上的切片，利用鐵絲或鍍子尖端撥開皺紋後，以載玻片撈置於約 35°C—40°C 的溫水上，使切片伸展。
- 1.9 立即以塗有甘油蛋白之載玻片撈上切片(靠近載玻片的中央偏下位置)，並在上方刻寫號碼，若玻片為磨砂或漆面則可用鉛筆書寫後，移入 56°C—60°C 之熱板伸展器中烘乾，準備染色。

[註一：切片注意事項]

- (1) 前後推拉刀固定座，不可向下施壓，以免有厚度不均勻的切片產生。
- (2) 組織塊及切片刀若固定不牢，螺旋若鬆弛，都會發生切片的跳

動。

(3) 浸潤的石臘，如果溫度太高(超過了 70°C)將影響切片的完整性，並使染色品質降低。

(4) 切片若不易切取，以口向石臘塊切面呵氣後再切，或許可收意想不到的效果。

(5) 除非有特別的要求，切片的厚度以 5 Microns 最為理想，過薄或太厚都不合標準。

(6) 經冰凍的石臘塊，較易切取。

(7) 切片刀不要在切片臘塊固定座上停留，切片時要以平穩的速度通過。

(8) 切片時切片機之拉動不可太猛，以免石臘崩裂。

(9) 切片機不用時，切刀應立即卸下，收藏於木盒內。

[註二：蛋白甘油製法及使用法] (市售代用品，其效果優於蛋白甘油)

1.製法:取蛋白清與等量之甘油混合，攪拌均勻後(攪拌要點好比打蛋，打得泡沫細微到分不出一個一個泡沫)加入少許麩香草腦(Thymol)當防腐劑，過濾後貯藏於冰箱內，可保存數月。

2.使用法:取紗布一塊潤濕蛋白甘油後，存放於培養皿(直徑約 9 cm)內備用。用時以手指(最好戴上橡塑手指套)拂拭紗布上之蛋白甘油，塗一薄層(愈薄愈好)於載玻片上。以此載玻片撈取上述石臘切片，烘乾後，經過脫臘、染色、水洗等過程，切片都不易脫落。

註：興大獸醫病理室則以 Gelatin 教法取代蛋白甘油法。方法是於熱水浴中每 2 公升水中加 0.1 克果膠，攪拌均勻，則於熱板加熱後石臘片可緊貼於玻片上。

2. 迴轉切片機：

切片的原理與滑動式切片機相同，其操作法略述如下：

整修石臘塊，使適合固定於石臘固定座上（目前用包埋匣，則尺寸一致）。

2.2 調整切刀角度(即刀面與石臘塊平面所形成之角度 Clearance

Angle)，通常在 5~10 度之間，較硬組織如子宮體或骨片等，可增至

15 度。

2.3 略以粗切後，調整石臘塊的方向，以期顯現組織之最大面。

2.4 迴轉切出的切片，必須使成帶狀，並連結在切片刀上。切片須不呈縐折，才算上乘。

乙 冰凍切片(Frozen Section)法

1. 低溫切片(Cryo-Cut)法

未經固定的組織，利用低溫切片的切片機可迅速製成近似石臘切片的標本。由於組織仍保存酵素活性和抗原性，所以在組織化學或螢光抗體法上，是不可缺少的重要方法。外科病理方面，如欲在手術中急於下診斷，或欲行脂肪染色及鍍銀染色，最常為人用。切片原理與迴轉式切片機相同。

1.1 冰凍切片及其染色(H&E 及多色次甲基藍染色法)

1.1.1 切片刀經常固定於切片機上，冷凍室平時經常保持在 -10°C ，一經通知有冰凍切片檢查，立即開動使溫度降至 -20°C 至 -30°C 之間。

1.1.2 一經收到新鮮組織，須立即由病理醫師切取適當小片，置之於滴有 Embedding matrix 或 O.C.T. Compound 的圓形組織台上，並再於組織上滴下數滴，然後移入低溫切片機的冷凍室內，冰凍約 1 至 2 分鐘。

1.1.3 將組織台固定於切片機，放下抗捲導片 Antiroll Guide(四方形，透明塑膠片，用以防止切片之滾捲)，覆蓋於刀面上，使與刀面成 30° --- 45° 度左右之角度，並與鋒面平行，使突出約 0.5mm。

1.1.4 轉動推進器，開始粗切至適當深度。切片刀及抗捲導片 Antiroll Guide 須經常保持清潔寂靜電蓄積。

1.1.5 以微調切取切片，當合適的切片延伸至刀面與抗捲導片之間時，打開抗捲導片，手持載玻片，平行靠近，沾取切片，即可獲得完整之組織切片。

1.1.6 染色，視目的何在而定。

2. H&E 染色法

- 2.1 將切片用 Milling 氏變法緩衝福馬林溶液(10%福馬林溶液或甲醇—福馬林溶液)固定 30 秒~60 秒。
- 2.2 略加水洗後，即在醋酸蘇木紫溶液(100ml, Mayer 氏蘇木紫溶液中加醋酸 5ml)中染 1~2 分鐘。
- 2.3 在氨水(二滴濃氨水/1000ml 水)中，切片顯現藍色。
- 2.4 略加水洗後，立即以 0.5%伊紅 Y(Eosin Y)染色，5 至 30 秒。
- 2.5 依次經過 80%、90%、100%，酒精脫水，再通過二甲苯—木餾油(Xylene - Creosote, 4:1)及二甲苯。
- 2.6 封蓋。

3. 多色次甲基藍(Polychrome methylene Blue)染色法

3.1[染色法]

- 3.1.1 冰凍切片或捺印抹片(Imprint Smear)以蒸餾水略加水洗。
- 3.1.2 染以 Polychrome methylene Blue 溶液，0.5~1 分鐘。
- 3.1.3 略加水洗，隨即以濾紙吸乾。
- 3.1.4 浸於 Tertiary Butyl Alcohol 脫水。
- 3.1.5 透明，封蓋。

3.2 [染色液]

Polychrome methylene Blue 溶液

次甲基藍.....	1 gm
碳酸鉀.....	1 gm
冰醋酸.....	3ml
蒸餾水.....	300ml

蒸餾水裝於 1 公升之燒瓶中，溶解次甲基藍及碳酸鉀。煮沸 10~15 分鐘後，隨即一滴一滴加入冰醋酸，並用力搖動，使形成之沈澱物溶解為止。

繼續煮沸，使溶液減為 100ml，冷卻後過濾使用。有效期限為 4 星期。

[染色結果]

細胞核.....藍色
背景.....不同色度之紅紫色

[註一]

- (1)冰凍切片機打開過久，會生霧結冰，影響機械之操作。如有此種情形，則在切片機或其滑道滴下不凍結之專用潤滑劑，以利操作。
- (2)蘇木紫溶液可選用 Mayer 氏變法，Harris 氏或 Carazzi 氏，染 1 分鐘。
- (3)切片刀的溫度若比組織低，則較易切取。
- (4)包埋劑:Embedding matrix(Lipshaw)為透明體，切取時組織較不易辨別 O.C.T.Compound(Ames)為不透明體，切取時產生靜電，切片有捲起的情形發生。
- (5)氨水的濃度要極稀薄，可避免組織切片的脫落、流失。

[註二]

利用液態氮與 Isopentane 的凍結；利用此法凍結，再以 Cryostat 切片機切取標本。此法較常用之於組織化學或螢光抗體法。

- (1) 以鋁箔紙藉瓶蓋作直徑約 1 cm，高 1~5 cm 之模型，注入包埋劑 O.C.T . Compound ，隨即將檢體埋於底部。
- (2) 以鋁杯盛 isopentane ，立即將鋁杯移入盛有液態氮之溫杯內。
- (3) 將鋁箔紙模型移入盛有 isopentane 之鋁杯後，此時模型內之包埋劑，很快呈白色，冷卸、凝固，約需 20 秒。
- (4) 剝離鋁箔紙，將包埋組織塊以 O.C.T.黏附定於圓形組織台上，隨即以切片機切片。

第六章 組織常規染色技術

甲 蘇木紫與伊紅染色法(Hematoxylin and Eosin stains)

一 前言：

此一染色在病理組織學中乃是最普遍而不可缺少的染色。蘇木紫，早在 1863 年首先為人應用，乃最有價值之自然染料。此染色法為雙重染色法，簡稱 H&E 染色。細胞核為蘇木紫溶液染成藍色，其他細胞質，細胞間物質大部份皆為伊紅溶液染成淡紅色至深紅色，可以觀察，掌握組織之全像。大部份病理組織學材料，均可憑此一染色法獲得診斷。雖然尚有其他多種特別染色法，但皆可視為本染色法之輔助染色。

二 染色法操作：

- 2.1 脫臘後，以蘇木紫溶液染 2~15 分鐘(時間可長可短，視蘇木紫溶液之不同而各異)。
- 2.2 水洗。
- 2.3 以 0.5%鹽酸溶液行分辨染色色度(分色)，約 1~5 秒。(若使用不必分辨染色度蘇木紫溶液，此一步驟即可省略)然後水洗數分鐘。
- 2.4 浸入氨水(水 1000ml 中，滴濃氨水 2 滴)至組織呈美麗藍色，約需數秒。
- 2.5 流水中沖洗，至少 15 分鐘(若沖洗過夜 2.4.項可以省略)。
- 2.6 染以 0.5%伊紅 Y 溶液，數秒至 2 分鐘。
- 2.7 依次通過 80%、90%、95%酒精。
- 2.8 移入 100%酒精，二甲苯—100%酒精(1:1)，二甲苯—木餾油(4:1)，二甲苯(I)，二甲苯(II) 各半分鐘。
- 2.9 以二甲苯使之透明。
- 2.10 封蓋。

三 染色液配方：

A. 蘇木紫溶液

蘇木紫是從一種植物 *Hematoxylin Compechianum* 由乙醚抽出的植物性染料。其本身單獨對組織(Tissue)的親和力甚小，必須氧化生成 Hematein 後，再與媒染劑，如鋁、鐵等結合，始具染色性。蘇木紫在空氣中或遇光線，會自然氧化，持續數天或數星期。這種氧化過程，使蘇木紫產生染色性，一般稱為成熟化(Ripening)。為加速成熟

化，可加入某些氧化劑，如碘酸鈉，高錳酸鉀，過氧化氫或氧化汞等，則此染色液立即可供使用。若加過多氧化劑，氧化過程雖加速，相對的染色效力則減退。所以氧化劑，需要適量方可。蘇木紫溶液最好貯存於黑暗及密閉容器內。因曝露於空氣或光線中，會加速氧化過程，削減染色效果。今介紹幾種蘇木紫溶液如下：

1. Mayer 氏蘇木紫溶液（進行性染色）

蒸餾水·····	1000 ml
鉀礬或鉀礬(Ammonium or potassium alum)···	50 gm
蘇木紫·····	1 gm
碘酸鈉(Sodium iodate)·····	0.2 gm
檸檬酸(Citric acid)·····	1 gm
水化氯醛(Chloral hydrate)·····	50 gm

以上完全溶解後(須特別留意鉀礬是否完全溶解)，立即可供使用。若染色效果不佳，首先檢視碘酸鈉之量，是否正確，可酌量減少。或加碘酸鈉 0.4gm，蘇木紫 2gm，作配製之改變。其染色性甚強。此液染色後呈紅紫色或淡酒紅色，但水洗呈藍色，不需以 0.5% 鹽酸分辨染色度。H&E 染色最常廣為人用，可貯存數月之久。最好貯存於黑暗處。

註：配製時，注意不可加熱，否則使用壽命縮短；先將鉀礬完全溶於水中，再加蘇木紫使完全溶解後加入碘酸鈉及檸檬酸及水化氯醛。

2. Harris 氏蘇木紫溶液（退行性染色）

蘇木紫·····	5 gm
100 酒精·····	50 ml
鉀礬·····	100 gm
蒸餾水·····	1000 ml
紅氧化汞(Mercuric Oxide, red)·····	2.5 gm

- 2.1 將蘇木紫溶解於酒精
- 2.2 鉀礬在水中加熱溶解。
- 2.3 將前二者混合後急速煮沸，最好不超過 1 分鐘就煮沸。
- 2.4 移開火源後，徐徐注入紅氧化汞，再煮沸至呈濃紫紅色。
- 2.5 置於水浴中儘速冷卻，然後過濾使用。使用前取 100ml 加 2 至 4ml 冰醋酸。
- 2.6 染色後以鹽酸分辨，此液染色力強，需用於剝脫細胞之染色。

2.7 缺點：雖依配方配製，結果不甚安定，易生沉澱物，常要過濾，因含有氧化汞，會發生公害問題，且煮沸需注意時間。

3. Weigert 氏蘇木紫(Iron hematoxylin)溶液

溶液(I):

蘇木紫.....1 gm
酒精.....100 ml

溶液(II):

氯化鐵(Ferric Chloride)29%水溶液..... 4 ml
蒸餾水..... 95 ml
濃鹽酸.....1 ml

(I)與(II)兩液等量混合使用，混合液約可保存一星期，染色時間1~15分鐘，常用於 Masson 氏 Trichrome 或 E.V.G等特別染色。

4. Gills 氏蘇木紫溶液

蒸餾水.....690 ml
乙二醇(Ethylene glycol) 250 ml
蘇木紫..... 6 gm
碘酸鈉.....0.6 gm
硫酸鋁(Aluminum Sulfate).....52.8 gm
冰醋酸..... 60 ml

以上充分溶解後，可立即使用，乃染色性甚強之染色液。

B. 伊紅 Y (Eosin Y) 酒精溶液

1. 伊紅 Y..... 0.5 gm
70%酒精..... 100 ml

此液 100ml，中加 2~3 滴冰醋酸可增強染色效果，應保存於冷暗處。

2. 保存液(Navy Alcoholic eosin)

伊紅 Y..... 10 gm
橙 G (Orange G) 2.5 gm
酸性復紅 (Acid Fuchsin) 1.26 gm
蒸餾水..... 300 ml
無水酒精..... 700 ml
冰醋酸..... 0.5 ml

先以蒸餾水完全溶解染料後，再加入無水酒精及冰醋酸。此液可長久保存。

『染色液』工作液

保存液·····	100 ml
70% 酒精·····	300 ml
3 · 80% 酒精·····	300 ml
0.2% 冰醋酸·····	100 ml
伊紅 Y·····	1 gm

先以冰醋酸液溶解伊紅 Y 後再加 80% 酒精溶液。

[註]：

(1)脫臘用之二甲苯，預先置於溫箱內，保持 40°C 左右，可縮短脫臘時間。二甲苯須注意更換。

(2)Mayer 氏蘇木紫溶液一般較常用。染色性安定，配製方便，有效期限較長，且不需以鹽酸分色。

(3)染色過程，切片須保持濕潤，不可使其完全乾燥，如此可避免失敗。

(4)脫臘用酒精，如發現呈白濁色，須拋棄換新。

(5)蘇木紫溶液染色後的氨水(可以 lithium carbonate 飽和液，加等量之水替代)，要極稀，不可浸入過久，以避免切片脫落，此一步驟可省略。

(6)蘇木紫溶液染色後之水洗，以 30 分鐘為最適宜，過久恐有褪色之慮，過短會影響藍色之顯現及切片標本之長久保存。所用的水質與標本的品質有密切關係。

(7)伊紅 Y 的染色深度，各學者的感受不同，但以淡紅色為準，照相的標本似可稍深。

(8)伊紅 Y 染後通過酒精，不宜浸洗過久，尤以低濃度酒精為然，應避免伊紅 Y 脫色，此一步驟有脫水及分色作用。

(9)木餾油(Creosote)可以石炭酸(Phenol)替代。二甲苯(I)及二甲苯(II)的主要目的為洗除木餾油，預防以後標本的褪色。

『染色結果』

細胞核，細菌為藍色。

細胞質、間質、各種纖維類概為淡紅色至紅色。

乙 脫臘(Deparaffinize)

石臘切片染色前均需先脫臘，始可染色。二甲苯為最常用的脫臘劑，苯(Benzene)亦可替代，但苯之毒性與燃燒性均較二甲苯大，故宜用二甲苯。操作順序如下：

1. 二甲苯(微溫)…………… 5 分鐘
2. 二甲苯(微溫) …………… 10 分鐘
3. 100%酒精…………… 浸1次
4. 95%酒精…………… 浸1次
5. 80%酒精…………… 浸1次
6. 70%酒精…………… 浸1次
7. 水洗數次，完全洗去酒精。

[註]

- (1)經過含汞固定液固定後的切片，經脫臘後，必須再做脫汞的處理。
- (2)在二甲苯中脫臘的時間，不必硬性規定，只要達到完全脫臘之目的即可。純度高或微溫的二甲苯可縮短脫臘時間。
- (3)脫臘過程所用酒精，目的在洗除殘留於切片的二甲苯，其濃度不須嚴加規定，只求所用濃度由高漸低即可。
- (4)將脫臘標本從酒精中移出水洗，當載玻片及水中呈現白濁狀沈澱時，顯示酒精中已混有多量的二甲苯，應該更換所有酒精。
- (5)脫臘過程中標本不可使其乾燥。

丙 封蓋 (mount)

標本染色後，通常須以封蓋劑封蓋玻片後鏡檢。可分為含水份與不含水份的兩種封蓋法。

A. 不含水份標體：

所有石臘切片標本，大致屬於這一類。即標本必須脫水後，才可封蓋，否則標本會呈白濁不清，難以鏡檢。以酒精為主的脫水方法，最常使用。即利用濃度逐漸提高的酒精，以達到脫水的目的。例如：經過 80%、90%、95%、100%等酒精後，以濾紙吸乾，隨即依次移入二甲苯、木餾油、二甲苯，再以 Entellan 等封蓋劑封蓋。小部份染色標本，利用烘箱烘乾脫水後，再行封蓋。現在已用不銹鋼製分隔提籃用手移動，不需要用濾紙，每個可以放入 30 片(另有盛 15 片和 50 片者)，但需要藥品 2~3 倍的用量。

[封蓋劑]

1. Entellan :是目前普遍為人使用的封蓋劑。價廉、透明無色，久不變色，以二甲苯稀釋使用，操作過程中不易揮發變硬，封蓋標本後，迅即揮發乾燥，故使用方便，乃 E. Merck 的產品。

2. **Canada Balsam**:為一種植物性香膠，過去多為人採用。以二甲苯稀釋，操作方便，經久保存後多呈深黃色，有礙外觀，不過不影響標本之品質。

3. **Permout**:一種合成樹脂，略帶黃色，以二甲苯稀釋，操作方便，亦為理想封蓋劑

B. 含水份的標本

有些特別染色的標本，如脂肪染色，蘇丹三號結晶紫(Crystal Violet)染色等，不可用酒精脫水，僅以濾紙輕輕吸取水份後，以水溶性封蓋劑封蓋。

[封蓋劑]

□ 甘油

□ 甘油明膠(Glycerin gelatin)

明膠..... 10 gm

水.....60ml

以上加溫至明膠完全溶解後，再加甘油 70ml，及石炭酸(Phenol) 1ml

□ Apathy 氏包埋介質(mounting media)

阿拉伯樹膠(Gum arabic) 50gm

蔗糖(Cane sugar) 50 gm

蒸餾水..... 150 ml

氯化鈉..... 10 gm

麝香草腦(Thymol)..... 0.1 gm

將阿拉伯樹膠、蔗糖及蒸餾水混合於燒杯，置於水浴中使之沸騰，俟各種成份溶解，再將氯化鈉、麝香草腦溶入。趁熱在保溫箱中過濾，再三更換濾紙，以利過濾，最後貯存於冰箱內。

註：現在已有多種水性封蓋劑可供選用。

第七章 組織特殊染色技術

1. 多醣染色法
2. 革蘭氏(Gram)染色法
3. 抗酸染色法
4. 鍍銀染色

甲 多醣染色法(Polysaccharides stains)：

以常用之 PAS 反應(Periodic Acid-Schiff's reaction) 做介紹。

切片經由過碘酸(Periodic acid)氧化後，利用 Schiff 氏試液作顯色反應。此反應主要使用於多醣類之檢查。對真菌類，細菌類亦呈陽性反應。欲知 PAS 反應效果如何，須有陽性標本，例如十二指腸等作對照染色。

『固定液』

Carnoy 氏液，中性福馬林緩衝液。無水酒精。

『染色法』

1. 石臘切片，6 microns。
2. 脫臘，水洗。
3. 浸以 0.5% 過碘酸溶液，5~10 分鐘。
4. 蒸餾水水洗，3 次。
5. 染以 Schiff 氏試液，10~15 分鐘。
6. 直接移入亞硫酸氫鈉 (Sodium bisulfite) 溶液，換 3 次，每次 3 分鐘。
7. 流水水洗，3~5 分鐘。
8. Mayer 氏蘇木紫溶液染核。
9. 水洗至標本呈藍色，約 15 分鐘。
10. 脫水、透明、封蓋。

『染色液』

1. 0.5% 過碘酸溶液
2. Schiff 氏試液 (以有市售成品)

配製: (a) 取 500ml 燒瓶盛 200ml 蒸餾水，煮沸後移離火源。

(b) 徐徐加入 2gm 鹽基性復紅(Basic fuchsin)或新復紅(New fuchsin)，充分攪拌，再煮沸 5~10 分鐘，使鹽基性復紅完全溶

解。室溫下冷卻至 50°C 後過濾。

(c) 加濃鹽酸 8ml 充分攪拌。

(d) 水浴冷卻至約 25°C 後，加無水亞硫酸氫鈉(Anhydrous Sodium bisulfite) 5gm，攪拌，充分溶解後，裝入 200ml 的褐色試瓶，不要太大，密栓放置於暗處。

(e) 2~3 天後，溶液如呈淡黃色，即可使用。若尚帶濃褐色，則加入約 1gm 的活性炭粉，攪拌放置 1 分鐘後過濾，即得無色液體。不過此一操作，可能須多做 1~2 次。此液保存於 4°C 冰箱，3 至 4 月液體若呈淡紅色，則不能使用。

3. 亞硫酸氫鈉溶液

10% 亞硫酸氫鈉溶液·····	6 ml
1N 鹽酸·····	5 ml
蒸餾水·····	100 ml

此液使用時配製，只可使用 1 次。

* 1N 鹽酸溶液：比重 1.19 鹽酸 83.5ml 加蒸餾水至 1000ml。

4. Mayer 氏蘇木紫溶液

【註】

(1) 水洗時，多醣類恐有擴散溶出之情形，因此，不宜放置水中太久。

(2) 配製 Schiff 氏試液時，沸水中加入鹽基性復紅(Basic fuchsin)，須提防溶液濺出。

(3) 標本在過碘酸溶液中的時間，以不起過 10 分鐘為宜，須時常換新過碘酸溶液。

(4) PAS 反應中，核酸氧化，因而對鹽基性色素的親和性增強，故染核的時間較短。

『Schiff 氏試液效力之判斷(Luma 氏法)』

37 ~ 40% 福馬林溶液 10ml 盛於白色磁皿，然後滴下 2 ~ 3 滴的 Schiff 氏試液，若試液瞬間呈紅紫色，則為效果好的試液。若顯色緩慢且呈深藍紫色，則表示試液的呈色反應欠佳，不能使用。

『染色結果』

澱粉(即肝醣 Glycogen)，黏液·····	紅~紫色
纖維蛋白，膠質纖維·····	桃紅色

網狀纖維，基底膜·····	· 紫紅色
阿米巴屬，真菌類、細菌類·····	· 紅色

乙 革蘭氏(Gram)染色法

這是革蘭氏(1853 ~ 1938)所發表的染色法。以下介紹 Brown& Brenn 變法；簡稱 B & B 革蘭氏(Gram)染色法。

『固定液』

10% 中性福馬林緩衝液。

『染色法』

1. 脫臘，水洗。
2. 略為以蒸餾水洗後，以 Hucker - Conn 溶液染 2 分鐘。
3. 略為水洗後，浸於革蘭氏碘變法溶液，2 分鐘。
4. 略為水洗並以濾紙吸乾水份，但不可完全吸乾。
5. 以酒精-丙酮脫色，直至藍色不再從切片脫落為止。
6. 直接移入鹽基性復紅(Basic fuchsin)溶液，3 分鐘。
7. 短暫洗以蒸餾水，換 3 次，並以濾紙吸乾。
8. 浸於丙酮 3 秒，一次以一張為限。
9. 以苦味酸 - 丙酮 (Picric acid - Acetone) 溶液分色及脫色，至切片呈黃粉紅色為止， 10 ~ 15 秒。
10. 浸於丙酮 - 二甲苯片刻。
11. 以二甲苯透明，Entellan 封蓋。

『染色液』

1. Hucker-Conn 溶液(變法)

10% 結晶紫(以酒精配製) ·····	2 ml
蒸餾水·····	18 ml
1%草酸銨(Ammonium oxalate)·····	80 ml
混合液至少可保存 2-3 年。	

2. 革蘭氏碘變法溶液

碘·····	2 gm
碘化鉀·····	4 gm
蒸餾水·····	400 ml

3. 酒精-丙酮溶液

無水酒精·····	50 ml
丙酮·····	50 ml

4. 0.3% 鹽基性復紅溶液(貯存液)

鹽基性復紅·····	0.3 gm
蒸餾水·····	100 ml

5. 鹽基性復紅溶液(使用液)

0.3% 鹽基性復紅溶液·····	5 ml
蒸餾水·····	45 ml

6. 苦味酸---丙酮溶液

苦味酸(Picric acid)·····	0.1 gm
丙酮·····	100 ml

7. 丙酮---二甲苯溶液

丙酮·····	50 ml
二甲苯·····	50 ml

『染色結果』

革蘭氏陽性菌·····	藍色
革蘭氏陰性菌·····	紅色
奴卡氏菌及放線菌絲·····	藍色
細胞核·····	藍色
其他組織·····	黃色

丙 抗酸菌染色法

利用此法證明組織內有無抗酸菌與抗酸性物質存在。

1. Fite 變法

抗酸菌染色法計有 Ziehl-Neelsen, Fite, Kinyoun, Wade 及 Auramine 等多種，但 Fite 變法最簡便，染色標本甚佳，乃最具代表性之染色法。

『固定液』

10%福馬林溶液，或其他固定液均可。

『染色法』

1. 脫蠟(必須加對照切片)，水洗。
2. 染以石炭酸復紅(Carbol fuchsin)溶液，室溫 30 分鐘。
3. 流水中充分沖洗。
4. 3% 酸性酒精充分脫色(分色)至切片呈無色或淡紅色為止。
5. 充分水洗，8 分鐘。

6. 次甲基藍(Methylene blue)溶液作對比染色，2--3 秒。
7. 流水沖洗。
8. 40°C烘乾，透明，封蓋。

『染色液』

1. 石炭酸復紅(Carbol fuchsin)溶液

(A) 溶液:鹽基性復紅·····	11 gm
95% 酒精·····	100 ml

俟其完全溶解後(可置於保溫箱)過濾，裝於褐色容器。

(B) 溶液:5%石炭酸溶液

使用液:(A)液與(B)液依 1 比 10 之比例混合使用。混合液的表面若出現黃金色物質，則為上乘染色液。

2. 3%酸性酒精

3. 次甲基藍溶液

貯存液:次甲基藍·····	1.4 gm
95% 酒精·····	100 ml
使用液:次甲基藍貯存液·····	10 ml
蒸餾水·····	90 ml

[註]

- (1)切片標本儘量薄切，染色過程留意切片剝落。
- (2)以酸性酒精脫色至切片呈淡紅色為止，不必完全脫色，亦不必擔心過度脫色。
- (3)若以證明 *Nocardia* 抗酸性為主要目的，則以 1%硫酸替代 3%酸性酒精脫色。
- (4)次甲基藍溶液之對比染色，淺染即可，若染色過度，即以 70%酒精脫色。
- (5)石炭酸復紅的貯存液，須經常注意其鮮度。
- (6)對比染色的次甲基藍可以蘇木紫溶液替代。

『染色結果』

抗酸性菌·····	紅色
紅血球·····	微黃、橙黃色
其他組織成約·····	淡藍色

2. Ziehl-Neelsen 染色法

『固定液』

任何固定液均可。

『染色法』

1. 脫蠟、水洗，通過 70% 酒精。
2. 染以石炭酸復紅溶液於 50°C 溫箱內，30 分鐘。
3. 略加水洗。
4. 以 1% 酸性酒精脫色(分色)，1~5 秒。
5. 充分水洗，5 分鐘以上。
6. 以次甲基藍溶液作對比染色，切片呈淡藍色。
7. 充分水洗。
8. 脫水，透明，封蓋。

『染色液』

1. Carbol fuchsin 溶液

石炭酸(於 37°C 溫箱內溶解).....	2.5 ml
100%酒精.....	5 ml
鹽基性復紅.....	0.5 gm
蒸餾水.....	50 ml

2. 次甲基藍溶液 (與 Fite 法相同)

『染色結果』

抗酸性菌.....	紅色
其他組織成份.....	淡藍色

丁 Warthin-Starry 石臘切片鍍銀染色法

『固定液』

10% 福馬林鹽水(Formalin-saline)溶液

『染色法』

1. 脫蠟，水洗，浸於緩衝液。
2. 浸於 1% 硝酸銀溶液(以緩衝液配製) ,55°C~60°C，1 小時。
3. 當切片在保溫箱加溫時，準備顯像液，備妥後必須立即使用，浸切片於 55°C 顯像液約需 1 分 30 秒，切片呈黃褐色。
4. 洗以 55°C~60°C 之溫水數次。
5. 以冷緩衝液洗滌。
6. 脫水，透明，封蓋。

『染色液』

1. 緩衝液

a. M/5 醋酸鈉(Sodium acetate)溶液:

16.4gm 醋酸鈉加水至 1000 ml。

b. M/5 醋酸溶液:

11.8ml 冰醋酸加水至 1000 ml。

使用液 a 液 15ml + b 液 18.5ml + 480ml 水，pH 3.6 即得。

2. 顯像液:

a. 緩衝液 10 ml + 0.3 gm 對苯二酚(Hydroquinone)。

b. 以 a 液 1 ml + 15ml 的 5% 明膠 (Gelatin)，保持 40°C。

c. 3ml 的 2% 硝酸銀溶液，保持約 55°C。

使用液:以 a 液與 b 液混合後立即使用即可。

『染色結果』

螺旋體..... 黑色

背景..... 淡黃褐色

第八章 獸醫病理用影像記錄法

一 前言：

獸醫病理在肉眼病變的記錄方面，固然可藉由文字之描述（這是最基本且是任何病理報告不可或缺的一部分）；但畢竟以文字描述影像總無法像以影像記錄法來得傳神與正確。故關於病變的影像記錄有其無法替代與忠實記載的特性。

一般醫用影像記錄法有三種：一為定像影像—如幻燈片、相片等。二為動態影像—如電影、錄影記錄。三為影像顯像複製—如 X 光片、斷層掃描、超音波等。第一種為最常用且最便宜。第二種主要用於臨床症狀之記錄。而第三種則已有專用軟體可供輸出。此三種影像記錄法目前已可用電腦方式管理、整理，甚至輸出。限於病理工作之需要，僅以定像影像做說明。

二 器械介紹：

關於定像影像，因為最常用故以下做較詳細之說明。所謂定像影像就是一般所謂的照相，而所用的器械就是所謂的照相機。以醫學用途而言（尤其是病理學），必要的配備包括：單眼相機、微距鏡頭（Micro Lens）、環形閃光燈、人工光源及翻攝檯。茲分述如下：

1. 單眼相機：單眼相機即所謂專業相機，特點是頂端有五稜鏡可將鏡頭所攝之影像反射到觀景窗，因此不會有視差（雙眼相機之拍攝鏡頭及觀景窗所見略有不同）。另一特點是可換裝多種鏡頭（微攝鏡頭為其中一種）。使用時，手握相機其快門務必快於 60 秒。且最好在光線充足的戶外或以攝影燈泡為光源；使用日光燈、水銀燈為光源時，色溫會明顯偏綠色，造成病變顏色失真，可加裝濾色鏡校正。
2. 微距鏡頭：微距鏡頭（又稱醫學用鏡頭）之焦距一般有 2 種：50—60 mm 及 90—110 mm。前者多用於可較靠近被照體可達（23 公分），而後者則否（常用於外科及牙科或昆蟲）。且於鏡頭後方加裝不同延伸套管後則可放大被照體達數倍。一般拍攝時，最好將光圈縮小，可得較大的景深（尤其是病變為立體或縐褶時）。而鏡頭之最大光圈數值越小則鏡頭玻片越大，越能在較暗的環境下對焦。（一般變焦鏡頭 Zoom Lens，有些有微距功能，但一般效果較差）
3. 環形閃光燈：由於使用微距攝影，再加上攝影者的陰影，往往被照體之受光便明顯不足，因此便需使用閃光燈；而閃光燈裝於鏡頭前

方才能避免相機機體與鏡身之陰影遮擋了閃光。而最好機相與閃光燈均有 TTL 測光 (through the lens) 則可得到較正確的曝光。閃光燈之使用需注意同步快門的設定 (一般為 1/125 及 1/90 秒)。光圈則因每一部閃光燈的閃光指數 (GN 值) 而不同。

4. 人工光源：一般為藍色攝影燈泡 (250W 或 400W)，使用時一定須為偶數個 (如此光線才能均勻)，但其最大的缺點為強光伴隨著高熱；使拍攝者可能燙傷，或者長時間使用造成標本表面烤乾，甚至冒煙。另一種則為太陽燈管，最大特點為較安全。其色溫為 5000°K 與一般太陽光之色溫接近，不會偏綠，且不會發熱，缺點是價格較高且較暗。但一般都使用四支。

5. 翻拍檯：翻拍檯之底座可以玻璃為底座，其下可放置壓克力片作為拍攝時之底色 (一般使用黑色、藍色與綠色)。而標本組織之容器則已無反光玻璃做成之淺盆盛裝，如此可做成組織與背景凸顯之效果，且無水痕破壞畫面。另外在翻拍檯旁須準備比例尺及吸水紙巾，作為標示與擦拭血污之用。

三 拍攝程序：

病理檢體一般來自解剖房與後送之福馬林固定標本，但均為潮溼的。因此在拍攝過程中，注意勿用濕手接觸開關，造成危險或相機滲入水分故障。而水滴濺到使用中的攝影燈泡一定會爆破開，不可不慎。而大面積玻璃的操作也要小心。因無反光玻璃較薄，不可盛放太重的被照物，拍攝過程如下：

1. 將相機固定於翻拍檯支柱上(相機固定最好能微調 X 軸與 Y 軸)。
2. 以無反光玻璃盆盛裝被拍之檢體，並將比例尺放置於旁且標示日期與病例號碼。(切勿將比例尺壓放於檢體上，應將尺放在畫面之底部或一側，並將尺墊高調整高度，使之與被攝物之位置高度約一致)。
3. 於相機觀景窗中觀察調整檢體位置 (使被攝體佔畫面之 65—80% 之面積)，注意畫面中檢體之水平線與垂直線 (此攝影為科學之記錄，故構圖以水平線垂直線明確，重點位於視野中央為標準)。調整相機之高度 (翻拍檯支柱高度) 可放大縮小畫面 (下降為放大，上昇為縮小)，每次調整相機高度均需再次對焦。
4. 燈光調整：先關掉四週位於天花板的日光燈；再打開翻拍用人工光源 (天花板的日光燈會干擾色溫且易形成玻璃面反光) 調整光源角度。一般光源與被攝面之水平夾角不得大於 45°，否則光源之光影反

光點會進入畫面。調光源之燈頭角度，使之對著畫面中央，如此光線才能均勻（四個燈泡對角線交叉點位於畫面中央）。將比例尺放於畫面之一側（並調整墊高其高度使之略與被照體焦點等高）。

5. 測光：由於使用人工光線，故每一次的光源照度應該都一致。因此於光源調整確定後便先行測光。測光原則以手持式測光表測入射光式測光（或以標準灰卡行反射光式測光）。若無測光表，則最簡單的方法為以手掌做被照體，使手掌佔畫面的 75—85%，打開相機測光表，進行測光（而光圈值最好設定為 8、11、16，則可得較佳景深）當測得光圈、快門值後便固定使用不要變動。（例如：在相同光源下，拍攝暗底色之肝臟病變與亮底色白肉雞皮膚病變。則測光值前者為不足，而後者為過度，實際上仍需用最早之測光值。否則依不足或過度值調整將使拍攝結果黑底色變為灰色，而白底色亦為灰色；因為相機測光表均將被測體設定為 18% 反射率之灰色）。

6. 拍攝：最好在相機快門處加裝快門線，如此較不會使相機接觸到水。而按下快門前須再次確認構圖。若拍攝使用負片（一般底片）則按一張便可，因可再加洗多張相片。但若使用正片（幻燈片）則若需要 3 張，則按三張。因幻燈片之翻拍往往失真很嚴重。且幻燈片顏色飽和度高是較好的病理記錄材料。

7. 拍攝記錄及資料整理：由於照相時每張影像中均有比例尺疾病例號碼與日期，故沖洗出來後可與病歷表及切片合併歸檔及閱片。當閱片完畢，寫完病理報告與顯微攝影後，連同前述報告與相片完成整份報告並結案。

四 顯微攝影：

顯微攝影即為以顯微鏡攝取切片下放大之影像。此處指介紹明視野之一般病理切片之攝影技術。有關螢光、位相差、干涉位相差及偏光或血液抹片、寄生蟲檢查之攝影法不在本處介紹。

1. 器械介紹：

顯微攝影以器械而言；幾乎單一品牌之不同套件，必然是一套組的。不同廠牌間互通幾乎是不可能。例如：Nikon 的顯微鏡是不可能接 Olympus 的照相系統。但是物鏡則在光徑相同及接頭口徑一致的前提下，不同品牌是可以互相流通。例如：Nikon、Olympus、Leica 等品牌物鏡，若光徑 160 mm 相同（均標明於鏡頭上）則可互通。

其主要元件如下：1.顯微鏡 2.測光及對焦系統 3.快門系統 4.底片盒 5.濾鏡組。

顯微鏡主要攝影控制部門有：電壓調整部份、聚光鏡光圈、濾色鏡、光徑目鏡攝影切換裝置。

使用顯微鏡觀察病理切片是病理工作人員最基本的技術，在此不多做說明。而測光與對焦系統隨廠牌不同而有不同規格，歐系規格其對焦鏡頭與目鏡相同（只需加裝附框之對焦用#字線鏡片即可），而日系規格則測光系統中有一稜鏡可分光做焦點再校正。

2. 操作方法：

2.1 將欲攝影之病理切片擦拭乾淨

2.2 打開顯微鏡與測光系統電源（顯微鏡之電壓使用 3-6 伏特）。

2.3 目鏡 / 攝影裝置接換至攝影位置（日系顯微鏡）

2.4 以矯正視力（戴眼鏡），觀察攝影對焦鏡頭，可見其內有#字線（或粗十字線）及取景框線。調整對焦鏡頭，使粗十字線成為#字線（本步驟涉及照相之成敗，一定要在眼睛非疲勞的情形下進行。且第一次的校正最準確，若操作一段時間再作取景對焦時，發現#字線又成為粗十字線，則表示眼睛疲勞，焦距不準，最好休息一下再來拍照）。取景框會因不同倍率的攝影用目鏡（photo lems）有不同範圍，不可看錯。

2.5 調整兩觀察用目鏡使兩眼焦距相同，並調整瞳距（目鏡附近 50 - 75 mm 刻度）使雙眼能不費力地長時間觀察顯微鏡。

2.6 顯微鏡之濾片選擇：平常觀察時擴散片 diffuser 及藍色濾片（NCB10 或 LBD 等）一定要用。但 ND（減光片）則無影響，可暫時不放。因擴散片可消去燈絲之強光影像，藍色濾片用以矯正燈泡之低色溫；ND 減光片為了矯正亮度。另外綠色濾片則是用於切片黑白攝影時，可增強對比（紅色加深，藍色較淡）。

2.7 觀察切片，找出要拍攝的部位及倍率，並旋轉載物台（Stage；玻片台）使被拍攝標本之水平與垂直線與框平行。（尤其有漿膜與黏膜構造之結構）。將主要病變放在視野中央區域。注意視野中是否有污點或組織縐褶等不良切片製作痕跡出現，應盡可能避免。最後由取景框中觀察，所要的視野及取景與倍率均在取景框中，否則

再進行調整。

2.8 選定光圈值：在選定物鏡之倍率後。於鏡頭鏡身有四個數字，第一為倍率，第二為 NA 值(光圈值)，第三為顯微鏡光徑長度(160 mm或無限大)，第四為蓋玻片厚度。故須注意第二個數字。調整聚光鏡光圈值至此數值(一般由 0.02—0.65)如此設定光圈(N A 值)可得最佳之解相力。註：亦可以 NA 值 \times 0.8 則效果會更好。

2.9 測光：一般顯微鏡測光法有兩種；一種為平均測光，一種為點測光。前者適合於明視野顯微鏡；而後者用於螢光及暗視野(測光比率為 1%—5%；越小越貴)。拍照時記得將測光法選定為平均測光；底片感光值設定(一般為 100°)；將電壓調到 9 伏特。此時由測光儀便可顯示曝光時間(一般約 0.01—0.10 秒之間)若顯示曝光過度則可加 ND 2 濾片以減少進光量，但不影響色溫。

2.10 再次確認取景與細部再對焦：由取景框再次校正 # 字線與調整細調節輪至完全清晰。最後按下快門便完成曝光。

第九章 屍體解剖圖解

1.解剖器械：磨刀棒、鋸、解剖刀、骨剪、鑷子

2.動物左側臥（頭在術者右邊），並以水略清洗。

3.自右腋下開第一刀至下顎頂端

4.反刀自中線向後方切開皮膚



5.開右髖關節，及右側胸腹部皮膚

6.自肋骨邊緣開腹膜至骨盆前緣

7.刺破橫膈（注意是否胸腔為陰壓）

8.沿胸肋關節由後向前切開至鎖骨



9.折斷肋骨，並取下

10.翻開肝，以左手掐住食道並割斷

11.將消化道移往體外左下方，並切下脾臟

12.取下肝臟



13.切斷舌骨，取出舌頭

14.抓住舌根及食道氣管，割開縱隔取下胸腔臟器

15.縱切開腎臟至腎盂

16.切開食道與氣管到支氣管



17.取下心臟行三刀開心法

18.自枕骨與第一頸椎間，切斷取下頭部

19.剝開頭皮，以三刀法鋸開顱骨

20.輕扣出大小腦



21.剪開恥骨左右翼並去除之

22.自此開口取出生殖泌尿道