

T/ ZSMM

浙江省数理医学学会团体标准

T/ZSMM 0004—2023

免疫组化染色显色校准质控方法

Method of calibrating coloration for immunohistochemistry

2023 - 12 - 22 发布

2024 - 1 - 22 实施

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 缩略语	2
5 试剂和材料	2
6 免疫组化染色操作步骤	3
7 免疫组化染色显色校准	4
8 免疫组化染色质控数据存储	6
附 录 A （资料性附录） 通用质控物技术原理	7
参 考 文 献	8

前 言

本标准按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本标准由浙江省数理医学学会提出并归口。

本标准起草单位：微邦（武汉）医疗健康产业有限公司、深圳市诺高实验器材有限公司、广州大学、武汉市武昌医院、湖北省临床检验中心、重庆市公共卫生医疗救治中心、重庆市急救医疗中心、湖北中医药大学、武汉谱尼医学检验实验室有限公司、珠海贝索生物技术有限公司等单位起草。

本标准主要起草人：钱峰、汪建阳、李涵、王显科、冯骥良、高志成、舒清明、罗琳、邹宇量、崔新伍、杨芳宇、王贝晗、吕梦雪、俞斌、谢征、敖伟、刘洪涛、魏世隽、邓晖、郑婵双、陈军、林志标、岑子祥、刘宴、朱威帧、董明国、冯斌、胡君、张玥、刘秀萍、沈鹤柏、易祥华。

免疫组化染色显色校准质控方法

1 范围

本标准规定了免疫组化染色显色校准方法相关的术语和定义、缩略语、方法原理、试剂和材料、仪器和设备、通用质控物制备、IHC实验步骤、免疫组化染色显色校准（MCC）和免疫组化染色质控数据。

本标准适用于病理技师或研究人员进行免疫组化染色反应的显色校准质控管理、对免疫组化化学反应过程是否合格的验证与评估，形成免疫组化显色结果最终的质量控制规范。

2 规范性引用文件

本标准暂无规范性引用文件。

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

3.1 二氨基联苯胺显色 DAB coloration

在免疫组化染色中使用二氨基联苯胺显色底物使标记辣根过氧化物酶的抗体经过反应后产生肉眼可见棕黄色颜色的化学反应。

3.2 通用质控物 allpurpose quality control object; AQCO

适用于免疫组化染色的系列小鼠、兔、驴蛋白混合物组合，可用于验证不同的标靶点：

- ① 其中一类蛋白混合物特异性与抗小鼠、兔的羊属第二抗体工作液结合，用于验证样本抗原修复情况及第二抗体工作液效价；
- ② 其中一类蛋白混合物不与小鼠、兔属第一抗体工作液及抗小鼠、兔的羊属第二抗体工作液发生特异性结合，作为阴性对照；
- ③ 其中一类蛋白混合物可与任何小鼠、兔属第一抗体工作液结合，配合封闭剂排除未结合的第一抗体，用于验证第一抗体工作液效价。

通用质控物可用作参照对象，具有规定特性，足够均匀和稳定，已被证实符合标称特性检查的预期用途。

注：通用质控物涉及免疫学技术创新应用，具体原理详见附录A。

3.3 通用质控载玻片 allpurpose quality control slides; AQCS

通用质控物（3.2）被预先铺贴于粘附载玻片上，用蜡膜封存，该载玻片用于任何组织标本的免疫组化染色。

3.4 免疫组化染色显色校准质控方法 method of calibrating coloration for IHC; MCC

在免疫组化染色中使用通用质控载玻片（3.3），依据给定的操作指南（6.1）来校准组织标本的显色情况。

3.5 显色校准 calibrating coloration

在免疫组化染色中，通过比对组织标本与同步染色的通用质控物显色情况，排除不合格因素，评估显色质量；同时可用已知抗原浓度的通用质控物（3.2）显色作为颜色深浅标准，辅助校准组织标本的显色程度。

3.6 质控数据 quality control data

用于判定检验结果是否符合预期的数据，包括且不限于抗原修复结果、第一抗体效价、第二抗体效价、显色结果（合格/不合格）等。

3.7 假阳性结果 false-positive results

分析物为阴性的样本，检测结果为阳性。

3.8 假阴性结果 false-negative results

分析物为阳性的样本，检测结果为阴性。

4 缩略语

下列缩略语适用于本标准。

AQCO:通用质控物(Allpurpose Quality Control Object)

AQCS:通用质控载玻片(Allpurpose Quality Control Slides)

IHC:免疫组织化学染色/免疫组化染色(Immunohistochemistry)

MCC:免疫组化染色显色校准质控方法(Method of Calibrating Coloration for IHC)

PBS:磷酸盐缓冲液(Phosphate Buffered Saline)

5 试剂和材料

5.1 通用质控物设计

5.1.1 每片免疫组化染色时使用新的通用质控载玻片，通用质控物与患者标本同步染色。

5.1.2 通用质控物应至少提供阳性、阴性对照功能。

5.1.3 通用质控物推荐设置多个（3个以上）梯度浓度靶点提供组织标本的显色参考标准。见图1。

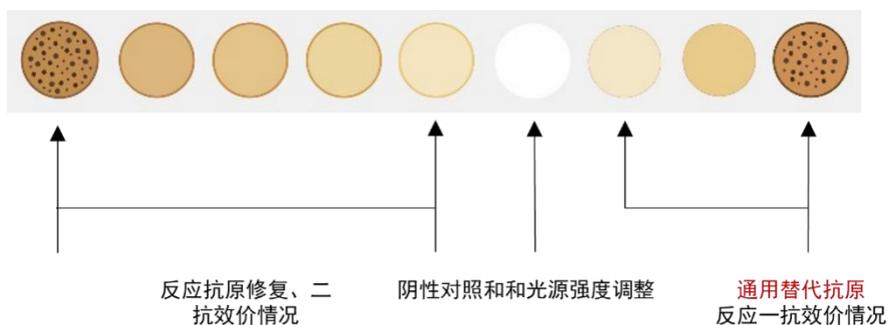


图1 通用质控物靶点

5.1.4 通用质控物应提供组织标本内抗原修复情况、第一抗体效价、第二抗体效价的评估功能，提供有效的质控信息。

5.1.5 通用质控物应提供显色背景颜色亮度值（0~255）的功能，来校准不同光源条件下观察结果产生的差异，以通用质控物阴性靶点亮度值=255作为校准参考。见图2。



图2 背景颜色亮度值调整示意

5.2 通用质控物制备

5.2.1 依次制备蛋白总含量相同但成分比例不同的小鼠、兔、驴来源 IgG 蛋白混合液，其中小鼠和兔蛋白组成比例为 1:1。

5.2.2 基于小鼠、兔 IgG 中的相同 Fc γ R I 位点制备通用型抗原蛋白混合液。

5.2.3 推荐使用蛋白 3D 打印技术打印出不同梯度浓度蛋白混合液标靶点。见图 3。

5.2.4 使用甲醛固定后，石蜡干封。

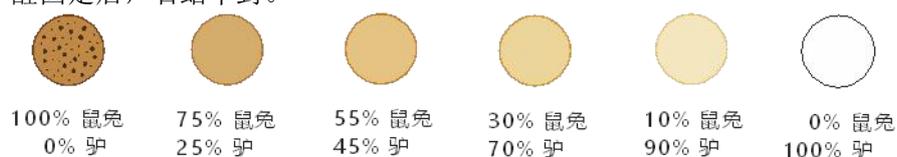


图3 蛋白混合液梯度比例

5.3 免疫组化染色试剂

5.3.1 小鼠或兔属第一抗体工作液（EDTA 热修复）。

5.3.2 抗小鼠、兔的羊属第二抗体工作液。

5.3.3 使用推荐的第二抗体封闭液：Bovine IgG（牛 IgG）、BSA（牛血清蛋白）、Donkey IgG（驴 IgG）。

5.3.4 PBS（pH 值=7.2~7.4，含 0.05% 吐温-20）。

5.3.5 EDTA 抗原修复液（50 \times ，使用时稀释至 1 \times ）。

5.3.6 3% H₂O₂。

5.3.7 DAB 显色液（辣根过氧化物酶型，pH=7.5~7.6）。

5.3.8 苏木素染色液（0.1%）。

6 免疫组化染色操作步骤

6.1 手工操作

- 6.1.1 裱贴有标本组织的通用质控载玻片脱蜡至水。
- 6.1.2 常规抗原热修复（修复温度不高于 97℃）。
- 6.1.3 PBS 浸泡 5min×2 次, 蒸馏水浸泡 3min×2 次。
- 6.1.4 3% H₂O₂ 室温孵育 5min~10min×1 次, 以消除内源性过氧化物酶的活性。
- 6.1.5 蒸馏水冲洗, PBS 浸泡 5min×2 次。
- 6.1.6 滴加第一抗体工作液（小鼠或兔属）, 37℃孵育 1h~2h 或 4℃孵育 12h 以上。
- 6.1.7 PBS 冲洗 5min×3 次, 滴加封闭液, 室温孵育 10min。
- 6.1.8 PBS 冲洗 5min×3 次, 滴加第二抗体工作液（羊属）, 37℃孵育 10min~30min。
- 6.1.9 PBS 冲洗 5min×3 次, DAB 显色 3min~5min。
- 6.1.10 自来水充分冲洗, 苏木素复染, 脱水, 透明, 封片。

6.2 全自动染色仪操作条件

全自动免疫组化染色仪应具备热修复模块, 且能够给定的操作步骤（6.1）设置相同的运行程序。

7 免疫组化染色显色校准

7.1 人工诊断

7.1.1 观察通用质控物显色情况, 外观形态有无机械性破损, 显色是否正常, 正常显色应为梯度深浅的第二抗体显色与第一抗体显色以及阴性不显色（透明）。

7.1.2 观察组织标本的显色情况, 外观有无机械性破损, 染色是否清晰。

7.1.3 通用质控物显色作为内参靶标显色, 比对组织标本与通用质控物的显色情况, 评估、校准出组织标本真实、正确的显色, 完成最后的阅片诊断。见图 4。

- 若免疫组化显色结果为组织无显色, 第二抗体内参从左至右棕黄色显色梯次减弱, 阴性对照无显色, 第一抗体内参无显色, 则判定本次染色过程第一抗体失效, 染色质量为不合格。
- 若免疫组化显色结果为组织无显色, 第二抗体内参、阴性对照、第一抗体内参均无显色, 则判定本次染色过程抗原修复出现问题（完全丢失抗原信息）, 染色质量为不合格。
- 若免疫组化显色结果为组织显色, 第二抗体内参从左至右棕黄色梯次减弱且仅 100%浓度靶标显色, 阴性对照无显色, 第一抗体内参仅高浓度靶标显色, 则判定本次染色过程第一抗体、第二抗体均存在效价问题, 染色质量为不合格。
- 若免疫组化显色结果为组织显色, 第二抗体内参从左至右棕黄色显色梯次减弱, 阴性对照无显色, 第一抗体内参无显色, 则判定本次染色过程出现第一抗体非特异性染色, 染色质量为不合格。
- 若免疫组化显色结果为组织弱显色, 第二抗体内参从左至右棕黄色显色梯次减弱但强度明显降低, 阴性对照无显色, 第一抗体内参梯次显色但强度明显降低, 则判定本次染色过程第一抗体、第二抗体均存在效价损失, 染色质量为不合格。
- 若免疫组化显色结果为组织弱显色, 第二抗体内参无显色, 阴性对照无显色, 第一抗体内参梯次显色但强度明显降低, 则判定本次染色过程抗原修复出现问题（丢失大部分抗原信息）、第二抗体均存在效价损失, 染色质量为不合格。
- 若免疫组化显色结果为组织显色, 第二抗体内参从左至右棕黄色显色梯次减弱, 阴性对照无显色, 第一抗体内参梯次显色, 则判定本次染色过程正常, 染色质量为合格。

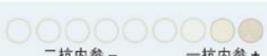
组织显色	内参靶标显色	质控判读
无显色 	 二抗内参+ 一抗内参-	✘ 不合格
无显色 	 二抗内参- 一抗内参-	✘ 不合格
有显色 	 二抗内参-/+ 一抗内参-/+	✘ 不合格
有显色 	 二抗内参+ 一抗内参-	✘ 不合格
弱显色 	 二抗内参± 一抗内参±	✘ 不合格
弱显色 	 二抗内参- 一抗内参±	✘ 不合格
有显色 	 二抗内参+ 一抗内参+	✔ 合格

图4 人工判读指南

7.2 人工智能辅助诊断

7.2.1 使用数字病理玻片扫描仪将待分析的免疫组化染色玻片扫描为数字图像，图像内容应包括组织标本与通用质控物的全部轮廓。见图5。



图5 通用质控载玻片扫描范围

7.2.2 根据通用质控物提供的显色背景颜色亮度值（0~255），将数字图像的背景颜色校准为标准光源下产生的正确显色，以通用质控物阴性靶点亮度值=255 作为校准参考。见图6。

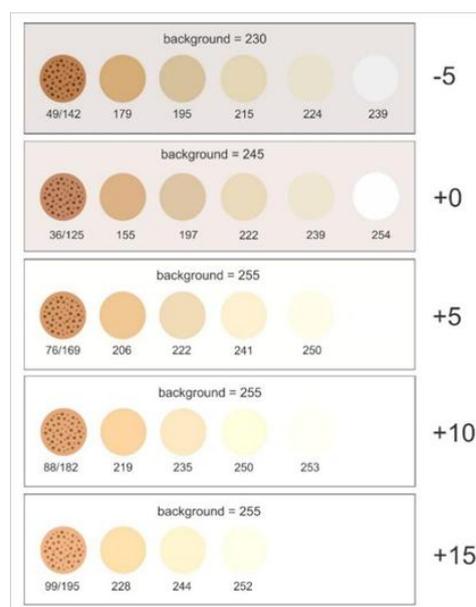


图 6 显色背景颜色亮度调节指示

7.2.3 根据通用质控物提供的抗原浓度信息和对应的显色程度作为参考，计算组织标本的相对光密度与相对抗原浓度，有效评估组织标本内真实的抗原情况。

8 免疫组化染色质控数据存储

免疫组化染色质控数据的储存信息应包括但不限于：

- 标本基础信息：门诊号、病理号、患者姓名、患者年龄、患者性别、患者联系方式、临床诊断、既往史、取材部位；
- 单位基础信息：医院名称、送检科室、送检医生、联系方式；
- 标本接收时间、IHC 操作时间、报告出具时间；
- 试剂耗材品牌型号、批次、批号；
- 手工染色或免疫组化自动染色机信息；
- 第一抗体、第二抗体有效浓度验证记录；
- 抗原修复结果评估：（合格/不合格）
- 第一抗体效价评估：（合格/不合格）
- 第二抗体效价评估：（合格/不合格）
- 显色质量评价。（合格/不合格）

附 录 A
(资料性附录)
通用质控物技术原理

A.1 通用质控物技术原理

A.1.1 该类蛋白混合物（小鼠、兔）与通用型羊属第二抗体发生特异性结合，无法与小鼠、兔属第一抗体发生结合。

A.1.2 该类蛋白混合物由100%驴蛋白组成，与小鼠、兔属第一抗体和通用型羊属第二抗体均不会发生结合。

A.1.3 该类蛋白混合物使用一种结构与小鼠、兔属第一抗体上的一个 Fc γ 1 点结合，该位点为非特异性位点，小鼠、兔属第一抗体均具有相同的氨基酸序列与结构。替代抗原结合模式见图A.1。

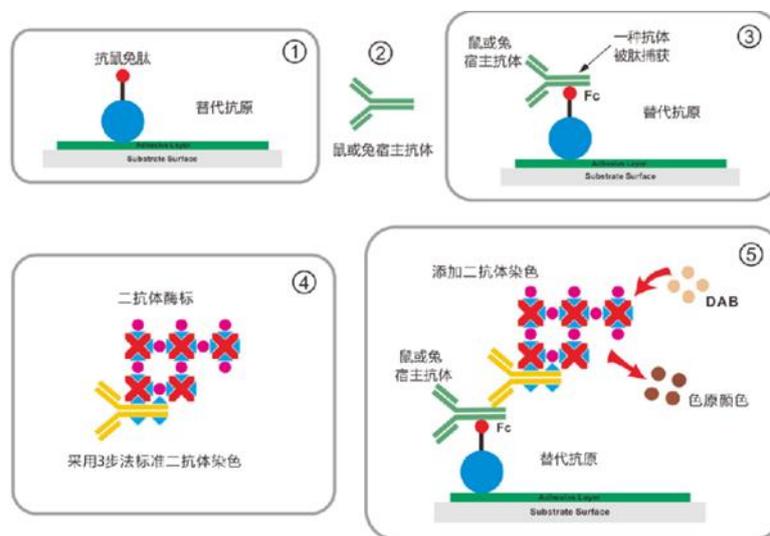


图 A.1 替代抗原结合模式图

参 考 文 献

- [1] GB 19781 医学实验室安全要求
 - [2] CNAS-CL02-A001: 2021 医学实验室质量和能力认可准则的应用要求
 - [3] GB/T 22576-2008 医学实验室质量和能力的专用要求
 - [4] GB/T 37864-2019 生物样本库生物质量和能力通用要求
 - [5] WS/T 494-2017 临床定性免疫检验重要常规项目分析质量要求
 - [6] CNAS-GL37 校准和测量能力（CMC）表示指南
 - [7] CNAS-CL02-A008-2018 医学实验室质量和能力准则在组织病理学检查领域的应用和说明
-