

ICS 点击此处添加 ICS 号

CCS 点击此处添加 CCS 号

# T/ZSMM

## 浙江省数理医学学会团体标准

T/ZSMM XXXX—2023

### 免疫组化染色显色校准质控方法

Method of calibrating coloration for immunohistochemistry

2023 - XX - XX 发布

2023 - XX - XX 实施

浙江数理医学学会 发布

# 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 仪器 .....	3
7 通用质控物制备 .....	3
8 IHC 操作步骤 .....	4
9 免疫组化染色显色校准 (MCC) .....	4
10 免疫组化显色校准数据 .....	6
附录 A (资料性) 通用质控物技术原理 .....	7
参考文献 .....	8

## 前 言

本文件按照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。

本文件由浙江数理医学学会提出并归口。

本文件起草单位：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、广州大学物理与材料科学学院联合起草。

本文件主要起草人：钱峰，汪建阳，李涵，王显科，杨芳宇，冯骥良。

本文件参与起草人：高志成，童英，王贝晗，舒清明，罗琳，邹宇量，崔新伍，王哲，周建华，邵春奎，邓晖，陈军，陈兵，黄代斌，林志标，岑子祥，王文雄等。

# 免疫组化染色显色校准质控方法

## 1 范围

本文件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。

本文件适用于病理医生或研究人员进行免疫组化染色反应的显色校准质控管理、对组织免疫化学反应的验证与评估，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

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 22576-2008 医学实验室质量和能力的专用要求

GB/T 37864-2019 生物样本库生物质量和能力通用要求

## 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

### 3.1

#### 显色 coloration

在免疫组化染色中使用DAB显色剂使标记HRP（辣根过氧化物酶）的抗体经过反应后产生肉眼可见的颜色的化学反应。

### 3.2

#### 通用质控物 allpurpose quality control object; AQCO

适用于免疫组化染色的系列鼠兔蛋白混合物组合：①该类蛋白混合物特异性与二抗结合；②该类蛋白混合物不与其一抗、二抗结合；③该蛋白混合物可与任何鼠兔属一抗结合，配合封闭剂排除未结合的一抗。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、一抗效价、二抗效价、显色结果（阴性、弱阳性和/或阳性）等。

## 3.7

**假阳性结果 false-positive results**

分析物为阴性的样本或患者，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或患者，检测结果为阴性。

## 4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

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

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 通用质控物宜设置多个（4个以上）梯度抗原浓度靶点提供组织标本的显色参考标准，如：强阳性（+++）、阳性（++）、弱阳性（+）、阴性等。见图1。

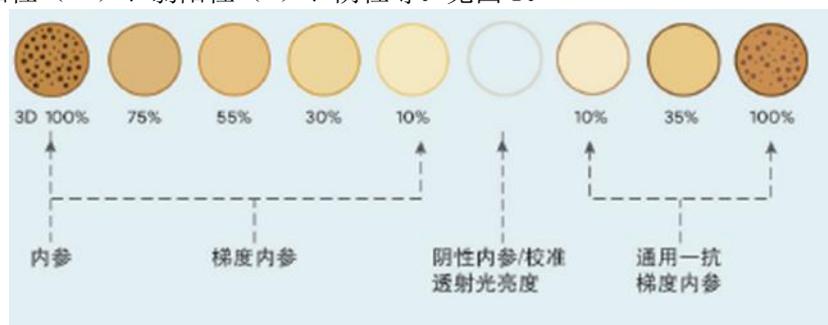


图1 通用质控物靶点

5.1.4 通用质控物应提供组织标本内抗原修复情况、一抗效价、二抗效价等评估功能，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。

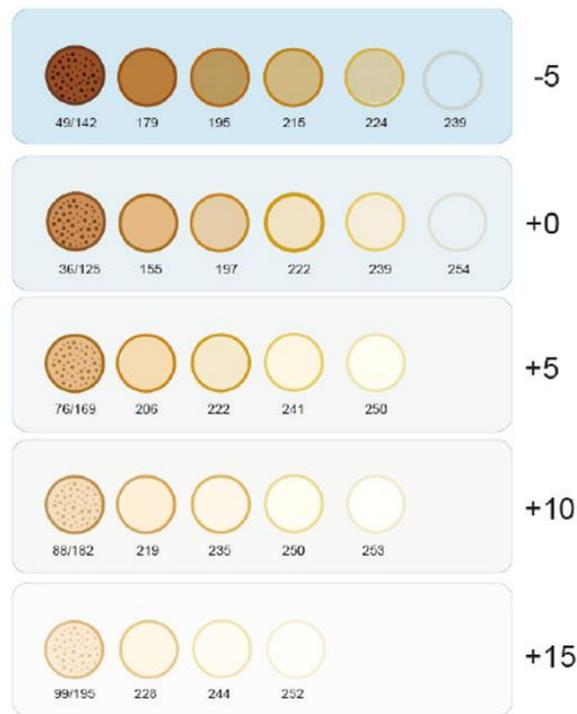


图2 背景颜色亮度值调整示意

## 5.2 试剂

- 5.2.1 鼠属或兔属一抗工作液（EDTA 热修复）。
- 5.2.2 羊属二抗工作液（一抗来源于小鼠或兔）。
- 5.2.3 使用推荐的二抗封闭液之一：Bovine IgG（牛 IgG）、BSA（牛血清蛋白）、Donkey IgG（驴 IgG）。
- 5.2.4 PBS（pH 值=7.2~7.4，含 0.05%吐温-20）。
- 5.2.5 EDTA 抗原修复液（50×，使用时稀释至 1×）。
- 5.2.6 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>。
- 5.2.7 DAB 显色液（辣根过氧化物酶型，pH=7.5~7.6）。
- 5.2.8 苏木素染色液（0.01%）。

## 6 仪器

免疫组化染色机应具备热修复模块，且能够按本文件给定的IHC操作步骤设置相同的运行程序。

## 7 通用质控物制备

- 7.1 依次制备蛋白总含量相同但成分比例不同的鼠、兔、驴来源 IgG 蛋白混合液。
- 7.2 基于鼠、兔 IgG 中的相同 Fc $\gamma$ 1 位点制备通用型抗原蛋白混合液。
- 7.3 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。
- 7.4 使用甲醛固定后，石蜡干封。

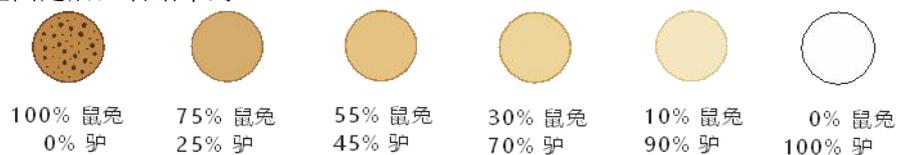


图3 蛋白混合液梯度比例

## 8 IHC 操作步骤

- 8.1 铺贴有标本组织的通用质控载玻片脱蜡至水。
- 8.2 常规抗原修复（修复温度不高于 97℃）。
- 8.3 PBS 浸泡 5min×2 次, 蒸馏水浸泡 3min×2 次。
- 8.4 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 室温孵育 5min~0min, 以消除内源性过氧化物酶的活性。
- 8.5 蒸馏水冲洗, PBS 浸泡 5min×2 次。
- 8.6 滴加一抗工作液（鼠属或兔属），37℃孵育 1h~2h 或 4℃过夜。
- 8.7 PBS 冲洗 5min×3 次, 滴加封闭液, 室温孵育 10min。
- 8.8 PBS 冲洗 5min×3 次, 滴加二抗工作液（羊属），37℃孵育 10~30min。
- 8.9 PBS 冲洗 5min×3 次, DAB 显色 3~5min。
- 8.10 自来水充分冲洗, 苏木素复染, 脱水, 透明, 封片。

## 9 免疫组化染色显色校准（MCC）

### 9.1 人工诊断

- 9.1.1 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二抗显色与一抗显色以及阴性不显色（透明）。
- 9.1.2 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。
- 9.1.3 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, 二抗内参从左至右棕黄色显色梯次减弱, 阴性对照无显色, 一抗内参无显色, 则判定本次染色过程一抗失效或没有正确的一抗, 染色质量为不合格。
  - 若免疫组化显色结果为组织无显色, 二抗内参、阴性对照、一抗内参均无显色, 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, 二抗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, 一抗内参仅高浓度靶标显色, 则判定本次染色过程一抗、二抗均存在效价问题, 染色质量为不合格。
  - 若免疫组化显色结果为组织显色, 二抗内参从左至右棕黄色显色梯次减弱, 阴性对照无显色, 一抗内参无显色, 则判定本次染色过程出现一抗非特异性染色, 染色质量为不合格。
  - 若免疫组化显色结果为组织弱显色, 二抗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, 一抗内参梯次显色但强度明显降低, 则判定本次染色过程一抗、二抗均存在效价损失, 染色质量为不合格。
  - 若免疫组化显色结果为组织弱显色, 二抗内参无显色, 阴性对照无显色, 一抗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）、二抗均存在效价损失, 染色质量为不合格。
  - 若免疫组化显色结果为组织显色, 二抗内参从左至右棕黄色显色梯次减弱, 一抗内参梯次显色, 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 MCC判读指南

## 9.2 电脑软件或人工智能诊断

9.2.1 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

9.2.2 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。

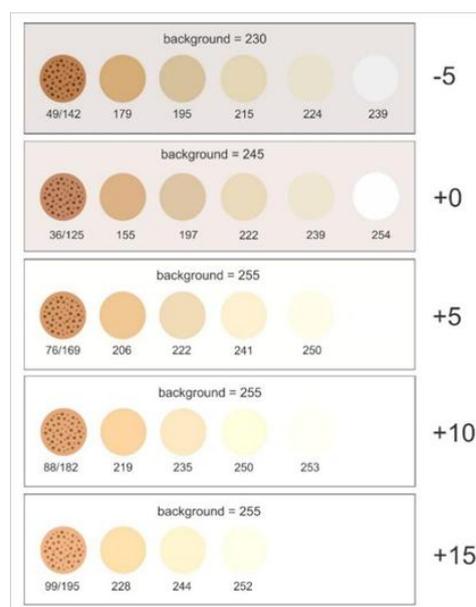


图 6 显色背景颜色亮度调节指示

9.2.3 病理医生利用电脑软件或人工智能，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。

## 10 免疫组化显色校准数据

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：住院号、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；
- 一抗、二抗有效浓度验证记录；
- 抗原修复结果评估；
- 一抗效价评估；
- 二抗效价评估；
- 显色质量评价。

附录 A  
(资料性)  
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（鼠、兔）与通用型羊属二抗发生特异性结合，无法与鼠、兔属一抗发生结合。

A.1.2 该类蛋白混合物由100%驴蛋白组成，与鼠、兔属一抗和通用型羊属二抗均不会发生结合。

A.1.3 该类蛋白混合物使用一种结构物与鼠、兔属一抗体上的一个 Fc $\gamma$ 1 点结合，该位点为非特异性位点，鼠、兔属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。

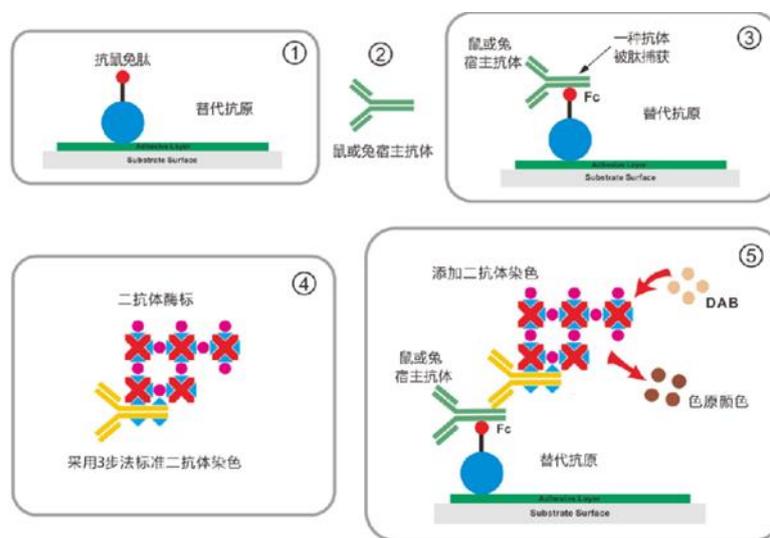


图 A.1 替代抗原结合模式图

### 参 考 文 献

- [1] GB 19781 医学试验室安全要求
  - [2] CNAS-CL02-A001: 2021 医学试验室质量和能力认可准则的应用要求
  - [3] GB/T 22576-2008 医学试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] 卫办医政发【2009】31号 病理科建设与管理指南（试行）
  - [8] CNAS-CL02-A008-2018 医学试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
-