



# 团体标准

T/CAS XXXX—2024

## 基于酶标二抗的免疫组织化学法检测石蜡 样本抗原的质量控制规范

Quality control specification for antigen detection in paraffin samples by  
immunohistochemistry based on enzyme-labeled secondary antibody

(征求意见稿)

2024-XX-XX 发布

2024-XX-XX 实施

中国标准化协会 发布

中国标准化协会（CAS）是组织开展国内、国际标准化活动的全国性社会团体。制定中国标准化协会标准（以下简称：中国标协标准），满足市场需要，增加标准的有效供给，是中国标准化协会的工作内容之一。中国境内的团体和个人，均可提出制、修订中国标协标准的建议并参与有关工作。

中国标协标准按《中国标准化协会标准管理办法》进行制定和管理。

中国标协标准草案经向社会公开征求意见，并得到参加审定会议的 75%以上的专家、成员的投票赞同，方可作为中国标协标准予以发布。

在本标准实施过程中，如发现需要修改或补充之处，请将意见和有关资料寄给中国标准化协会，以便修订时参考。

本标准版权为中国标准化协会所有，除了用于国家法律或事先得到中国标准化协会的许可外，不得以任何形式或任何手段复制、再版或使用本标准及其章节，包括电子版、影印件，或发布在互联网及内部网络等。

内部讨论资料，严禁非授权使用

中国标准化协会地址：北京市海淀区增光路 33 号中国标协写字楼

邮政编码：100048 电话：010-88416788 传真：010-68486206

网址：www.china-cas.org 电子信箱：cas@china-cas.org

目次

前言..... III

1 范围..... 1

2 规范性引用文件..... 1

3 术语和定义..... 1

4 实验基本要求..... 2

    4.1 人员要求..... 2

    4.2 实验室环境基本要求..... 2

    4.3 设备要求..... 3

    4.4 试剂要求..... 3

5 组织前处理..... 4

    5.1 组织固定..... 4

    5.2 组织脱水..... 4

    5.3 组织透明..... 4

    5.4 组织浸蜡..... 4

    5.5 组织包埋..... 5

    5.6 切片和烤片..... 5

6 操作程序..... 5

    6.1 染色流程..... 5

    6.2 免疫组织化学染色的判读..... 6

7 免疫组织化学染色的质控..... 7

    7.1 概述..... 7

    7.2 室内质控..... 7

    7.3 室间质评/实验室间比对..... 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。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件起草单位：

本文件主要起草人：

本文件为首次发布。

内部讨论资料，严禁非授权使用

# 基于酶标二抗的免疫组织化学法检测石蜡样本抗原的 质量控制规范

## 1 范围

本文件规定了基于辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶标记二抗的免疫组织化学技术开展临床石蜡样本检测的实验基本要求、组织前处理、操作程序、免疫组织化学染色的质控的要求。

本文件适用于运用辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶标记二抗的免疫组织化学技术进行检测的免疫组织化学检测实验室的质量控制。

## 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 2985—2008 生物显微镜
- GB/T 11446.4 电子级水电阻率的测试方法
- GB/T 11446.8 电子级水中总有机碳的测试方法
- GB/T 11446.9 电子级水中微粒的仪器测试方法
- GB/T 11446.10 电子级水中细菌总数的滤膜培养测试方法
- GB 15066 不锈钢压力锅
- GB/T 23128 电磁灶标准
- GB/T 29791.2—2013 体外诊断医疗器械制造商提供的信息（标示） 第2部分：专业用体外诊断试剂；
- YY/T 1244—2014 体外诊断试剂用纯化水；
- YY/T 1652—2019 体外诊断试剂用质控物通用技术要求；
- ISO 8037-1 光学和光学仪器 显微镜 载玻片 第1部分：尺寸、光学性能和标志
- 国家卫健委病理专业医疗质量控制指标（2024年版） 中华人民共和国国家卫生健康委员会

## 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

### 3.1

**免疫组织化学** immunohistochemistry; IHC

利用抗原与抗体特异性结合的原理，通过化学反应使标记在抗体上的显色物质（荧光素、酶、

金属离子、同位素、色原体)显色来检测组织细胞抗原,对其进行定位、定性及半定量检测的技术。

[来源: YY/T 1181—2021; 3.1]

### 3.2

**组织固定** organizational fixation

将组织浸入适宜的固定剂,使细胞内的物质尽可能保持在其生活状态时的形态、结构和位置的过程。

### 3.3

**抗体** antibody

由免疫原性物质刺激 B-淋巴细胞产生,并能与免疫原性物质结合的特异性免疫球蛋白。

注:免疫原性物质的分子包含一种或多种带有独特化学成分的部分,即表位。

[来源: YY/T 0639—2019; 3.1]

### 3.4

**抗原** antigen

在免疫学中,凡能刺激机体免疫系统产生抗体,并能与其相应抗体发生特异性反应的物质。

## 4 缩略语

HRP: 辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase)

AP: 碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase)

AEC: 3-氨基-9 乙基咔唑 (3-amino-9 ethyl carbazole)

DAB: 二氨基联苯胺 (diaminobenzidine 3,3)

PBS: 磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer)

## 5 实验基本要求

### 5.1 人员要求

人员要求包括:

- 负责免疫组织化学判读及技术工作的实验室技术负责人应具备足够的能力(可依据适当的教育、培训、经历、职称或所应技能证明等进行能力评价),从事组织病理诊断/技术工作至少 3 年以上;
- 实验技术人员应具有医学、生物学、药学、实验技术等相关的背景,经培训、考核合格后方可开展实验操作;
- 人员配置的数量应与开展的检验项目、检测量相匹配。

### 5.2 实验室环境基本要求

免疫组织化学检测实验室应符合临床实验室建设规范要求,实验室空间设置应考虑免疫组织化学染色机、纯水仪、电磁炉、蒸汽压力锅、恒温箱、生物显微镜等设备厂商要求,满足空间、温度、湿度、电源等指标,并进行充分的生物安全风险评估,针对生物、化学、放射及物理等危害制定防护性措施及合适的警告;

环境基本要求包括：

- a) 应依据检测设备和检测过程的要求，建立免疫组织化学检测实验室设施和环境要求；免疫组织化学实验室的空间和布局应与实验室活动相匹配，宜设立单独的免疫组织化学染色区域；
- b) 有害试剂应在通风橱中操作；
- c) 医疗废物的处理应符合医疗废物管理规定；
- d) 每年应对工作区进行有害气体浓度检测，保证有害气体浓度在规定许可的范围；
- e) 免疫组织化学染色水质应符合 YY/T 1244 的要求，纯水仪的电导率/电阻率测定应符合 GB/T 11446.4 的要求，总有机碳测定应符合 GB/T 11446.8 的要求，总细菌总数应符合 GB/T 11446.10 的要求，微粒数应符合 GB/T 11446.9 的要求。

### 5.3 设备要求

#### 5.3.1 通用要求

免疫组织化学实验室应制定设备管理程序，程序应包括但不限于设备的选择、采购、安装、验收、操作、运输、存放、使用、维护及停用的程序。

#### 5.3.2 免疫组织化学染色机的选择

免疫组织化学染色机应至少包括：

- a) 全自动液路系统；
- b) 机器清洁系统；
- c) 控温系统；
- d) 条码扫描系统；
- e) 组织保护系统；
- f) 试剂混合配置系统；
- g) 染色系统；
- h) 试剂安全（有毒废液与无毒废液区分排放，方便科室收集有毒废液）；
- i) 软件要求（软件具备升级功能、数据储存功能、质量控制功能和打印功能，可与现行的病理科网络连接）；
- j) 报警及安全指标：设备监测指标异常、设备故障时具备报警功能。

#### 5.3.3 电磁炉和蒸汽压力锅选择

电磁炉的选择应符合 GB/T 23128 的要求、压力锅的选择应符合 GB15066 的要求。

#### 5.3.4 生物显微镜的选择

免疫组织化学实验室所用生物显微镜的物镜像差、成像清晰范围、物镜转换器、载物台、显微镜支架、视场清晰、调焦机构、物镜放大率、目镜放大率等应符合 GB/T 2985—2008 的要求。

### 5.4 试剂要求

#### 5.4.1 通用要求

免疫组织化学实验室应制定试剂耗材管理程序，程序应包括但不限于试剂耗材的选择、采购、验收、操作、运输、库存管理。

#### 5.4.2 免疫组织化学抗体及显色剂的选择

免疫组织化学抗体及显色剂的选择的要求包括：

- a) 一抗、二抗和显色剂等应选择具有注册证或备案证的试剂，预期用途和检验方法原理应符合 GB/T 29791.2—2013 的要求；
- b) 一抗应根据抗体的特点选择。单克隆抗体的特异性优于多克隆抗体，兔抗的敏感性优于鼠抗，重组蛋白抗体在特异性和稳定性方面更佳；
- c) 选择二抗时要选择与组织无交叉反应的酶标二抗；
- d) 显色剂的选择：HRP 标记的二抗均可选用稳定性好的 DAB 作为显色剂；当组织内含有黑色素时可选用 AP 显色。

### 6 组织前处理

#### 6.1 组织固定

组织固定要求包括：

- a) 标本在离体后应及时剖开固定，在 60min 之内完成固定，不能及时固定的，应于固定前 4℃ 冷藏存放，存放时间不应超过 12h；
- b) 常规固定应使用 10% 中性缓冲福尔马林（pH 7.2 ~ 7.4）；
- c) 固定液应充分覆盖组织标本，体积宜为组织大小的 4 ~ 10 倍；
- d) 固定时间根据组织大小，在 6h ~ 48h 之间，直径小于 2 mm 的活检组织固定时间不应少于 6h，直径大于 5 mm 的组织固定时间宜在 24h ~ 48h；
- e) 含骨组织应先充分固定后进行脱钙，使用含酸脱钙液脱钙后宜用 pH 8.0 ~ 10.0 的 EDTA 缓冲液进行中和，以减少抗原因脱钙液而破坏。

#### 6.2 组织脱水

组织脱水的要求包括：

- a) 使用梯度乙醇脱水；
- b) 脱水过程应缓慢进行，每种梯度乙醇的作用时间宜设定为 60 min ~ 120min；
- c) 在设定脱水程序之前，应进行脱水效果的有效性验证；
- d) 脱水剂应定期或根据组织数量进行更换，确认达到脱水效果。

#### 6.3 组织透明

组织透明的要求包括：

- a) 透明程序建议使用二道透明剂，宜根据组织的类型和大小及脱水机的效率每道时间应设置在 15min ~ 60min；
- b) 透明剂的使用应在通风橱中进行；
- c) 透明剂应定期或根据组织数量更换。

#### 6.4 组织浸蜡

组织浸蜡的要求包括：

- a) 透明后的组织应经过 2 ~ 3 次浸蜡程序，每次时间为 30min ~ 90min；
- b) 建议使用熔点为 56℃ ~ 58℃ 或 58℃ ~ 60℃ 的优质切片石蜡，浸蜡温度控制在 60℃ ~ 62℃；

- c) 监控石蜡温度和石蜡缸内的容量，及时更换和补充石蜡。

## 6.5 组织包埋

组织包埋的要求包括：

- a) 建议使用合适熔点的石蜡同 6.4 a) 的要求；
- b) 在包埋组织时，应根据所处理组织的类型决定组织的包埋方向；
- c) 每包埋一个盒子样本，应更换一把镊子，防止组织污染。

## 6.6 切片和烤片

切片和烤片的要求包括：

- a) 切片厚度为  $2\mu\text{m} \sim 4\mu\text{m}$ ；
- b) 载玻片的选用应符合 ISO 8037-1 的规定，采用粘附载玻片，捞片应平整无气泡，组织方向应该一致；
- c) 根据烤片温度确定烤片时间，例如  $60^\circ\text{C} \sim 65^\circ\text{C}$  烤片时间应控制在  $60\text{min} \sim 120\text{min}$ ， $70^\circ\text{C} \sim 80^\circ\text{C}$  烤片时间应控制在  $30\text{min} \sim 60\text{min}$ ，切勿高温长时间烤片。

## 7 操作程序

### 7.1 染色流程

开始实验前，核对样本检测信息，核对无误后进入实验环节。免疫组织化学的染色流程分为手工操作流程和全自动免疫组织化学染色机流程。

#### 7.1.1 免疫组织化学染色的手工操作流程

手工操作流程包括：

- a) 脱蜡、水化；
- b) 抗原修复（根据一抗说明书选择热修复方式或酶修复方式）；
- c) 蒸馏水清洗；
- d) 3%过氧化氢封闭内源性过氧化物酶，室温孵育 10min；
- e) 蒸馏水清洗；
- f) 用免疫组织化笔在距离组织  $2\text{mm} \sim 3\text{mm}$  处画圈；
- g) PBS 清洗 3 次，2min/次；
- h) 滴加适量一抗和对照试剂， $37^\circ\text{C}$  1h 或  $4^\circ\text{C}$  过夜（具体条件可根据一抗说明书进行）；
- i) PBS 清洗 3 次，2min/次；
- j) 滴加适量二抗试剂（HRP/AP 标记二抗）， $37^\circ\text{C}$  20min（具体条件可根据二抗说明书进行）；
- k) PBS 清洗 3 次，2min/次；
- l) 显色剂显色，根据不同酶标抗体检测系统合理搭配显色剂（详情见表 1），HRP 标记通常建议选择 DAB 显色，AP 标记建议选择固红或固蓝显色；
- m) 复染，应根据颜色对比清晰的原则进行搭配，详情见表 1；  
注：常用的细胞核复染剂有苏木素和核固红两种，不同的复染试剂染色结果颜色不同，其中苏木素呈蓝色，核固红呈红色。
- n) 流动水冲洗；
- o) 分化和返蓝（根据复染剂的需求），流动水冲洗  $3\text{min} \sim 5\text{min}$ ；

- p) 梯度乙醇脱水，二甲苯透明，中性树胶封片（如 DAB 显色）或水溶性封片剂封片（如 AEC 显色）。

表1 免疫组织化学检测中显色剂与复染剂的选择

| 二抗标记酶 | 显色剂      | 复染剂 |
|-------|----------|-----|
| HRP   | DAB      | 苏木素 |
| HRP   | AEC      | 苏木素 |
| HRP   | Magenta  | 苏木素 |
| AP    | 固蓝       | 核固红 |
| AP    | 固红       | 苏木素 |
| AP    | 新复红      | 苏木素 |
| AP    | BCIP/NBT | 核固红 |

7.1.2 免疫组织化学染色机的操作流程

操作流程应参照设备说明书进行。

7.2 免疫组织化学染色的判读

7.2.1 免疫组织化学染色结果的判定原则

判定原则包括：

- a) 应同时设立对照染色；
- b) 抗原表达应在特定部位，且定位清晰准确，而无背景染色；
- c) 阴性结果的判读应谨慎，尤其在无对照染色的情况下，应区分真阴性和假阴性；
- d) 尽量避开出血、坏死、刀痕和边缘细胞的阳性表达；

应结合苏木素伊红（Hematoxylin-eosin; HE）染色、临床资料、影像学等综合分析免疫组织化学染色结果的意义。

7.2.2 免疫组织化学染色结果的判读结果

定位判读结果包括以下内容。

- a) 定位判读：根据抗原在特定细胞中的分布，分为细胞膜型、细胞质型、细胞核型、复合型（细胞膜+细胞质或细胞核+细胞质或细胞膜+细胞质+细胞核）四种阳性细胞类型。根据阳性细胞呈现的形态特点，分为局灶型、弥漫型、腔缘型等；
- b) 定性判读：免疫组织化学染色结果判读过程中，多数染色结果的判读为定性。阳性是指在对照染色结果可信的前提下，信号出现在预期部位，强度可以被观察到，反之则为阴性；
- c) 半定量判读：在临床诊断中，有些免疫组织化学染色结果对于治疗具有一定指导意义，这些项目均有相应的判读标准，应按照相应的判读标准判读。表达缺失判读：临床诊断中，有些肿瘤基因变异在肿瘤细胞无表达，而肿瘤间质细胞为阳性表达，如错配修复蛋白等。

7.2.3 免疫组织化学染色结果判读的注意事项

注意事项包括：

- a) 抗体的不同克隆号在不同组织中的定位不同，此时应标注阳性部位；
- b) 某些抗体在不同肿瘤类型表达的部位不同，此时应标注阳性部位；

- c) 组织的前处理不佳导致的抗原异位，此时不应判读为阳性；
- d) 免疫反应的形态是判读的重要参考依据，如嗜铬粒素（chromogranin A; CgA）等的染色应呈细胞质内的颗粒状，如呈胞质均匀一致的染色效果，则染色结果不可靠；
- e) 有些抗原（如错配修复基因等）在正常组织普遍表达，而在特定的肿瘤中缺失表达；
- f) 由于检测方法灵敏度有高低之分，有时可因染色方法灵敏度不够，而导致假阴性反应。

## 8 免疫组织化学染色的质控

### 8.1 概述

免疫组织化学检测实验室应制定室内质控程序和室间质评计划以保证结果的有效性。

### 8.2 室内质控

室内质控包括：

- a) 免疫组织化学检测实验室应根据国家卫健委病理专业医疗质量控制指标（2024 年版）设立免疫组化染色切片优良率以反映免疫组化切片染色及制片质量，免疫组化切片质量考核标准参考 CNAS-GL048: 2021 的 A.1.4；
- b) 宜在每张切片上使用外部对照作为质控物；
- c) 宜定期对质控数据进行分析；
- d) 有室内质控失控时的处理流程。

### 8.3 室间质评/实验室间比对

室间质评/实验室间对比包括：

- a) 免疫组织化学检测实验室应根据国家卫健委病理专业医疗质量控制指标（2024 年版）设立免疫组化染色室间质评合格率（指参加省级及以上病理质控中心、国际标准化组织或中国合格评定国家认可为等质控机构组织的室间质评）。室间质评不可获得的项目，可参考 WS/T 415 通过与其他实验室比对的方法确定结果的可接受性。
- b) 实验室应室间质评/实验室间比对结果，当结果不合格时，应采取适当措施。

## 参考文献

- [1] YY/T 0639—2019 体外诊断医疗器械 制造商为生物学染色用体外诊断试剂提供的信息
- [2] YY/T 1181—2021 免疫组织化学试剂盒
- [3] WS/T 415—2013 无室间质量评价时实验室检测评估方法
- [4] CNAS-CL02—2023 医学实验室质量和能力认可准则
- [5] CNAS-CL02-A001 医学实验室质量和能力认可准则的应用要求

内部讨论资料，严禁非授权使用

---

ICS 11.100

CCS C 05

关键词：中国标准化协会、模板

---