

免疫组化室内质量管理实用指南

前言：免疫组化（IHC）已成为病理医生不可或缺的辅助诊断手段，但个体化诊疗时代，要求病理医生通过这一“非定量”方法来确定预后及预测性指标的“量化”表达，因此对其进行质量管理意义重大。本期我们编译了范德堡大学医学中心Cates等人关于实验室IHC质量管理方面的一篇文章，篇幅虽长，但难以面面俱到，因此我们尽量保持了文章的完整性，旨在抛砖引玉，期待广大病理同仁更好的心得、经验分享。

IHC质量管理（QM）主要包括三个部分：质量控制（QC）、质量保证（QA）和质量改进（QI）。三者相互有所不同，但又相互关联。从实用的角度说，QC包括IHC检测过程中从标本接收至报告出具各个方面的优化，当然也包括IHC实验的验证以确保其准确性和重现性。QA是建立日常质量控制得以实施的方案及程序，及其他的质量控制监测指标；QI则是“通过数据分析及科学方法对操作进行持续评估及调整的方案”。QC、QA及QI的目标一致，均为提高IHC结果的准确性，当然也包括结果的恰当解读及报告。

表1. IHC室内质量管理方案

	质量控制	质量保证	质量改进
每日	查阅质量控制切片	评估/探讨分析问题 评估/探讨重复染色 所需时间记录	
每周	设备维护	向医学主管报告重复染色并分析问题/解决方案 新近验证过的抗体IHC染色前瞻性监测/回顾	
每月		评估IHC所需的时间 监测不常进行的IHC项目	向解剖病理学质量管理委员会提QA/QC报告
每半年		参加外部室内质评 病理报告内部审查 复审常规监管要求（如CAP、CLIA等）	向解剖病理学质量管理委员会提交质控监测结果 向解剖病理学质量管理委员会提交复审结果
每年	对实验室技术装备及人员配备进行审查	审查并更新质量管理方案 审查并更新IHC操作手册	继续教育 审查特殊IHC的数量（并检查库存） 将本实验室IHC结果与已报道文献数据进行比较
按需	对新项目进行优化 新项目校验 新试剂批号验证	疑难问题分析解答 实施校正方案	操作流程标准化 新平台及新试剂（如抗体、检测系统等）的评估

质量控制（QC）

外科病理学中，IHC染色“质量”的根本在于目的抗原存在时是否能检测出来（即敏感性），而不存在时是否呈阴性（即特异性）。这就要求从接收标本开始就要进行质量控制，且各项质控记录应由实验室至少保存2年。

组织固定及处理

标本送达病理实验室后，应立即剖开固定，否则延迟固定可能导致抗原弥散。低温虽可以延迟蛋白的水解，但不能完全阻止，而这也导致IHC出现假阴性或由于非特异性结合而导致背景染色。不过冷缺血对不同抗原影响不一：就膜类抗原而言，延迟固定1小时以内就会对IHC染色产生不利影响，其他抗原则似乎更加稳定（可长达12小时）。福尔马林固定的细胞块中细胞数量非常重要，应对这一指标重点关注。

固定不充分及组织处理过程的差异也是导致IHC结果不可靠、不一致的两个重要因素。标准化操作的一个必然要求是所用固定液及固定程序必须优化，并且单独进行验证。一般建议用磷酸盐缓冲液配制的10%中性福尔马林，至少固定6小时（最长为24小时），这在

许多实验量大的实验室很难达到。如果选择其他固定液或固定方案，则必须进行独立验证。文章作者赞同Allen Gown等人提出的“各实验室应根据具体情况调整，而不是生硬的按照指南的固定时间来做”，但关于乳腺预测性指标的标本固定问题，必须遵守(ASCO)/CAP相关指南。

抗体及检测系统的评估

实验室一旦确定进行新的检测项目，则应进行文献检索，确定应用哪种抗体。也可从其他单位的能力验证报告或网络资源中收集相关抗体的数据，重点要考虑临床特定诊断项目中抗体应用的准确性。

首先要确定的问题之一是应用多克隆还是单克隆抗体，或即用型(RTU)还是浓缩型抗体最合适？多克隆抗体可提高检测敏感性，却会增加非特异性反应和背景染色的可能性，但这种不良影响可通过额外的蛋白阻断步骤达到最小化。相对多克隆抗体而言，单克隆抗体特异性增强。通常来说，鼠单抗的敏感性会有所降低，而兔单抗的敏感性相对较好，因而目前被频繁用于一些临床实验室。即用型抗体一般生产用于特定的染色平台和/或特定的检测系统，其优点有：不同批次间的一致性、可重复性高，同时排除了抗体滴度测定时可能存在的室内误差；其主要缺点是优化染色流程时，在摸索抗体最佳浓度方面会耗费大量成本。

检测系统也会影响IHC染色的质量，其影响力堪比一抗，因此抗体与检测系统都要优化才能协同取得高质量的结果。因亲和素-生物素为基础的检测系统会与内源性生物素相互反应而产生非特异性、假阳性着色，所以目前常用检测系统多为酶/抗体偶联多聚物检测试剂盒。

染色流程标准化

标准化的意义在于提高精确性、或批次间的重现性，可通过每日使用标准质控切片来评估。“标准化”要求遵照已编写的实验室操作规程，该规程应明确抗体克隆、产品编号、最佳抗体稀释度、采取的抗原修复技术和修复时间、使用的检测系统、推荐的对照组织和预期的免疫表达部位等。

除上述提到的几个方面外，IHC操作手册还需记录该项目检测的原理和临床意义、标本采集(固定)的要求、结果的判读、该检测方法学局限性(如干扰因素等)、相关参考文献、组织质控过程出现问题时的补救措施，也包括实施补救措施后未能进行检测的措施(如送至其它特定的参考实验室)。

一抗染色条件优化

优化即“实验室连续测试和修正部分流程直到产生一致性的高质量结果”，优化包括了系列检测及个别因素的调整(连续测试和一些影响因素的调整)，如抗原修复方案(修复时间、方法、pH值、修复液)、抗体浓度(如为浓缩型抗体)、一抗孵育时间及温度、检测系统的类型及孵育条件、显色剂的孵育时间。还要注意大部分自动染色仪对孵育温度的调节都有限，一般采用系统建议的检测方案，因此程序优化过程中可供调节的参数并不多。优化过程中诸多仪器参数的组合极为复杂，这也算此类平台的一个显著缺点。

目前，还无法针对某一特定抗体预测哪些参数的组合是最优的，IHC检测的优化仍是一个主观过程。因此，合理的做法是先查阅生产厂商建议，除抗体相关信息外(如抗体克隆号、免疫原性、免疫球蛋白亚型、总蛋白浓度、抗体浓度、储存条件和稳定性)，供应商产品说明书一般也会提供最佳IHC染色条件所需的大量原始信息，如推荐的抗体稀释度、抗原修复方法、预期用途、产品局限性和诊断预期表

现(敏感性和特异性)。不过，方案优化绝不能局限于供应商的建议，供应商基于各自实验室的前处理条件(组织固定和处理)和实验条件对IHC试剂进行优化，但每一个实验室均需根据其具体用途进行IHC染色优化。从一抗文献数据情况来看，与其它实验室进行探讨，并分析室内质评项目相关报告可能会有所帮助。

考虑技术及经济因素的不同，不同的实验室有不同的优化策略，各有各的优缺点。一个常见的建议是使用“棋盘法”，即使用有限的抗体(需涵盖到厂家推荐稀释度范围)来比较不同抗原修复技术的影响。无论用什么样的优化方法，所采取的程序均应有良好的理论基础和明确的文字记录。

抗原修复是用福尔马林固定的组织进行IHC的关键步骤。最常用的两种抗原修复方法即热修复和蛋白水解修复。文章作者推荐热诱导的修复法，因为蛋白水解修复抗原对于组织固定的时间差异更敏感。不同试剂批次，酶活性不同，这也会带来过程的不可控性。此外，外部能力验证机构的经验表明，酶修复方法相比热修复来说容易产生更大的批次间差异。

有几个因素会影响抗原热修复的效果，但最重要的似乎是修复液的温度、热处理持续的时间、所用缓冲液的类型及pH值(如pH6.0的柠檬酸盐、pH8的EDTA、pH10的Tris-HCl等)，因此必须对热诱导抗原修复方法中这些变量进行优化。前述最佳染色条件的相关建议，都有助于选择最佳的抗原修复条件。当然，不要忘记并非所有的IHC都能从抗原修复中获益，有时候是没必要进行抗原修复的。最佳的抗原修复方案一旦确定，则应使用这一方法对一抗进行浓度探索以确定可获得最佳信噪比的抗体浓度。

可考虑应用蛋白封闭液(如来自二抗种属的血清稀释液或BSA)降低非特异性染色，有时需酶阻断法来降低内源性过氧化物酶或碱性磷酸酶活性所致的非特异性染色。

优化过程中经常忽略的是用于优化的组织的选取。显然，组织中必须存在目标抗原，但也要考虑该测试的预期敏感性和临床用途。由于低分化肿瘤细胞中组织特异性抗原的表达显著减弱，因此目标抗原水平相对高的正常组织就不适用于染色条件优化：使用染色优化时呈强阳性的正常、非肿瘤组织可能造成检测敏感性不足，难以检测出弱阳性组织，并导致假阴性。理想状态下，用于优化的组织应为目标抗原弱阳性，以证实该检测具有足够的敏感性可以检出低水平的表达。此外，用于优化的组织必须包含已知阴性的细胞类型，以评估该染色方案的特异性。

IHC实验的验证

临床实验室改进修正案(CLIA)规定，用于临床的IHC检测必须经过验证以确认其结果精确并具有重现性。由于没有已知抗原水平的标准品，因此测定“实验敏感性”或抗原可检出的最低限度并不可行，这也不适于常规诊断IHC。不过，可以明确的是实验室必须确定每种抗体的等效“检测极限”或“可报告范围”。从实用角度而言，可表示为预期染色模式(哪种细胞阳性、哪种细胞阴性)以及预期阳性病例比例(敏感性)、阴性病例的比例(特异性)。“技术”验证则仅表明IHC染色是有效的，“临床”验证则是确保该实验能达到临床诊断的预期目的。因此，验证时所用的阳性和阴性对照组织应该能够反映抗体用于实际诊断时的预期用途。理想的情况下，应选择免疫反应相对宽泛的组织用于验证。除借鉴医学、科学文献和室内质评项目结果外，其他有用的参考信息如The Human Protein Atlas和the Human Protein Reference Database等均可在在线查阅。一旦这些参数得以确定并记录在案，则验证工作就转到确定IHC检测的诊断准确性及精确性。

表2. 抗体验证文件记录重点

抗体信息
分类 (体外诊断试剂 (IVD)、仅供研究用的试剂 (RUO)、分析纯试剂(ASR))
供应商/克隆号/产品编号
表达该抗体的组织
材料与amp;方法
验证时采用的组织类型
用于检测的切片数量
接受或拒绝的标准及一致性阈值
最低可接受的95%置信区间
记录
验证受检切片的结果 (包括日期)
总结
结果一致性分析及精确性/重现性
达到预期/非预期结果的切片意见
对于实验一致性的总体意见
关于特异性、敏感性和重现性的意见
参考文献

IHC验证过程中证实实验准确性所需的切片数量尚无一致性意见，最后可由实验室的医学专家确定。某种程度上，这是因为不同的抗体具有不同的报告体系 (阳性/阴性、核着色的比例、HER2评分等)。很明显，相比二分法体系而言，验证评分法体系时所需样本数量更多。对于二分法体系而言，包括CAP及CLSI在内的多个权威机构建议用10张以上的阳性样本、10张以上的阴性样本即可，但也有专家建议加倍。

统计学分析支持CAP/CLSI提出的约20个样本的建议。文章同时设计了表格进行分析，指出检测验证时的95%置信区间在15个样本和20个样本时差别不大 (80% vs. 84%)。因此，可接受的95%置信区间取决于医学决策。某一特定抗体此前在某个实验室及常规外科病理中验证时的经验也会显著影响该决策；新出现的诊断指标的验证相比已充分证实、广泛应用的抗体如AE1/AE3，验证要更加严格。但每个抗体，无论选择什么样的最小置信度，决策过程都应该记录在IHC操作手册中。这一原则同样适用于病理档案中的低发病率抗原，对这些抗原而言，通常难以获得充足的阳性对照数量。就这些病例来说，95%的最小置信区间应该在优化中标出并进行前瞻性监测。

准确性的评估，是通过在相同组织中与此前已验证的抗体进行比较而确定的。如果无此前已验证的室内IHC检测供比较，则可将本实验室进行的IHC染色结果与其他实验室相同组织的结果进行比较。尽管已有建议指出，可将该结果与此前验证过的非IHC检测结果 (如原位杂交、流式细胞学等) 相联系来进行验证，但文章作者认为这样做并不合适，因为蛋白基础上的检测与分子基础上的检测具有显著不同的检测敏感性。其他不太严谨、但却相对满意的临床验证方法还有将预期结果与文献中结果相比较，以确定可用于诊断的标准。尽管预测和预后标记物的验证需要的样本数量比常规标记物更多，CLSI关于“通过比较染色结果与已验证的临床结果之间的相关性”的建议对多数临床实验室包括那些大型的学术医疗中心来说根本不可行。

很多专家强烈支持组织微阵列 (TMA) 用于验证性实验，但TMA中组织取样数量有限，或会带来标志物局灶性、散在异质性表达的问题。有学者认为用TMA相比大切片而言可能会低估阳性染色的比例，尽管可从每一标本中选择不同区域或组织块来做多个组织芯点，并将组织芯直径加大也能减少这些影响，但将TMA用于QC还是建议只用于已知为均质性表达的抗原。

精确性，或实验重现性，是通过多批次验证来评估该实验室中不

同日期、不同仪器间的差异。IHC操作过程中任何显著的改变，包括实验前处理条件的改变，都需对该实验进行重新验证。

试剂新批次的验证

新的试剂批次，尤其是一抗及检测系统，用于临床诊断前必须进行验证。这一过程无需像正式实验验证那样进行广泛验证，但也必须记录在操作手册中。大部分实验室都会通过少量已知阳性和阴性对照组织切片来比较新旧批次间的性能差异。而有些病理专家则建议除了进行平行实验外，还需要进行新批次试剂系列浓度的测定，而供应商所做的定期QC测试，旨在减少市售抗体批次间的差异。任何抗体浓度的变动都可以通过与原来的批号的说明书进行比较和回顾。这种情况下，就像任何IHC流程中出现任何大变动，都需要对该实验进行重新验证。

日常质量控制 (QC)

IHC质量管理的关键是回顾及分析每日的常规质控切片。除确定明显的实验错误如：加错了抗体 (对照切片及患者组织出现了非预期染色模式) 或试剂被污染 (如，出现于组织切片之外平面上的颗粒状着色) 外，认真分析日常质控对照切片可尽早发现实验敏感性或特异性的降低。相关规定及措施应注明如何进行IHC实验的监测和必要时采取的纠正措施。此外，若真的出现了问题，那么解决方案也应记录下来。

每次IHC还有两个必须考虑的对照类型：证实实验敏感性的阳性对照和该实验特异性的阴性“组织”对照。按照CAP对部分IHC实验的规定，无需进行阴性试剂对照。

阳性组织对照

阳性对照组织必须明确含有目标抗原，且应按照患者受检组织进行相同的固定、处理及包埋。这样一来，对照切片中出现预期染色模式，则证实检测中从固定至复染的所有步骤均达到了预期效果。用作阳性对照的组织应能够反映该抗体的预期诊断用途。如前所述，尤其推荐应用抗原表达水平较低的组织块，以证实该检测具有足够的检测敏感性，避免假阴性。

最佳做法是在每张患者组织切片中加入对照部分，以证实此次IHC实验是在同张切片上进行的 (特别考虑到在自动化染色平台偶有出现加样错误)。因此，已知可表达目标抗原 (如内皮细胞表达的CD31和CD34) 的正常组织成分用作阳性内对照，具有独特优势。这种情况下，实验方案必须明确指出该类对照的判读方法。如果判读某批次IHC染色的病理工作者可获得相应的对照切片阅读权限，分批对照也是可以接受的。还要注意，预先切好并且在室温下存储数日的对照切片可能会丢失抗原性。

IHC染色优化需要牢记的一个问题是，某些实验室中对某些组织类型所用的组织处理过程是不同的，如细胞学标本细胞块、小组织活检标本、需要延长固定时间的较大脂肪标本等。对于不同处理过程的标本的IHC染色均进行阳性对照并不实际，因此合理的做法是对于处理过程近似的组织选择部分常用指标 (如角蛋白、S-100、LCA) 进行阳性对照。

阴性组织对照

已知不含目标抗原的组织接受检样本进行相同操作后，可用作阴性组织对照，它可通过证实无交叉反应来评估一抗的特异性。阳性对照蜡块中如果也含有明确不存在目标抗原的细胞类型，则阳性和阴性对照可以在同一阳性对照切片上完成。若无法做到，则阳性和阴性对照可合并至一个腊肠样的蜡块中。而无论选择什么方法，都必须记录在操作手册中。

阴性试剂对照

阴性组织对照评估的是一抗的特异性，而阴性试剂对照则是通过监测患者样本中的非特异性背景染色来验证该实验其它组分的特异性，阴性试剂对照只是简单的将患者的切片运行全套IHC实验过程，但其中用“阴性一抗试剂”（一般是无关抗体、未经免疫的血清或缓冲液）来代替一抗。随着基于聚合物基础的检测系统的广泛使用，对于非使用亲和素-生物素检测系统的单位，CAP实验室认证项目已取消了阴

性试剂对照的要求。也可考虑CLSI的建议：当至少2种以上抗体用同一组织块检测时，任意一种标记物阴性的区域均可用作其他标记物的阴性对照。此外，阴性试剂对照有时可用作识别内源性色素颗粒（如含铁血黄素、黑色素、脂褐素）导致的非特异性染色，这种颜色易与DAB反应产物的特异性染色相混淆。本文作者所在的实验室，和其他实验室一样，并不会常规进行阴性试剂对照；但如果这一对照有助于确定真正的阳性反应，也是可以单独进行阴性试剂对照的。

质量保证（QA）

QA项目包括但不限于确立日常质控的规定和程序及解决实验过程出现的问题。其他QA措施还有：（A）回顾实验中的错误（重复染色的原因）；（B）监测每次实验所需的时间；（C）室内质量评价（能力验证）；（D）科室内部评议或审查回顾；（E）对不常进行的IHC项目进行监测；（F）前瞻性监测并回顾新验证的IHC项目（尤其是那些新出现或只进行了有限数量病例验证的抗体）。总的QA项目及实验室操作手册也应每年进行回顾，重点关注许可认证机构监管要求的变化。这种年度回顾的结果和QM项目及IHC操作手册的校正或修正也应记录在案。

重复染色的切片

实验室应在日志中详细记录需重复进行IHC染色的切片信息和原因。这可以使QM项目组监测需重复染色的切片比例以进行QA跟踪，并将问题归类为随机性或复发性。此外，所采取的纠正措施及相应结果也应记录在日志中。

室内质量评价（EQA）

室内质量评价或能力验证项目可用于提醒那些IHC检测可能被不合理优化或似乎有内部QC标准但表现不如其它实验室的实验室管理者。通过仔细推敲各个室内质评项目产生的结果，可以确定几个不同实验室间表达欠佳的某些抗体克隆号。虽然这些问题多为分析性或技术性的，或者有时是诊断判读问题或选用了不恰当的组织作为优化或验证的对照。比如Copete等人发现CK假阴性IHC结果的根本原因是应用了CK高表达的正常组织来进行检测优化及日常质控。根据程序要求，也可以发现出具报告的病理工作者无意中的误判。

国际上几个知名的室内质评机构包括：CAP、UK NEQAS、Nordiqc和CIQC（加拿大IHC室内质评机构），而国内CCP免疫组化室内质评项目，每年举办两次室内质评活动，在一定程度上带动了国内病理人参与室内质评活动的积极性。值得注意的是这些质评机构是对外部（质评机构或其指定实验室）提供的未染色切片的染色模式进行评估，并不评估每个实验室的实验前处理条件。室内质评项目中关于检测及结果报告的细节（如检测结果未达QA标准时所采取的措施）也应记录在实验室操作手册中。

病理报告的审核

IHC结果的准确报告是IHC实验中QA需考虑的另一方面。对于用于指导患者诊疗决策的外科病理报告来说，最重要的是要记录每一种染色的结果和结合病理诊断进行的简要解读。如使用这种简要指南，可以让临床医生明确诊断用途（确定组织学类型、亚分类、治疗反应预测和微生物的鉴定等）和结果的意义。除ASCO/CAP的乳腺预测性指标报告要求外，病理报告中关于技术及QC数据方面的其他细节并没有用，如有的话，在报告中加入这些信息反而是种干扰。

因此，除非报告的是预测性或预后指标，否则本文作者不赞同将标本的可接受性、固定、特异抗体克隆、抗原修复方法、检测系统和所用的阳性及阴性对照等信息纳入外科病理报告中。同样，外科病理报告也不适合纳入阳性对照和阴性对照切片的阅片和评估情况、预期结果及实际结果（这一信息应记录在日常质控日志中）。这方面唯一的例外是预测性及预后性指标的报告结果。总之，必要时所有的信息都可追溯，且IHC实验室应保存所有记录（包括文字记录及数字存盘），这一点非常关键。

相反，应提供关于一抗的详细信息以充分传达其诊断意义（如只写“角蛋白”是不够的，而写AE1/AE3、CAM5.2、CK8/18、CK5/6、CK903会更合适些）。某些情况下，建议记录其分布方式（如S-100的表达为局灶性、还是弥漫性）或在细胞内的定位（如 β -catenin是核着色、还是胞质着色）。如果病理报告中纳入了I类分析纯抗体所进行的IHC检测结果，则报告中必须注明政府管理规定中关于“单个实验室有责任保证染色质量”的免责声明。病理报告中体现IHC结果的代表性图片需由医学专家定期回顾。

质量改进（QI）

QI主要目的是对实验室新设备、新技术（如染色平台、检测系统）及试剂（如抗体）性能和评价的总体评估，包括医学人员和技术人员的继续教育。每年要回顾每种IHC染色的次数，可能会发现某些项目已基本不用了。另一个有用的QI建议，是与其他实验室、外部能力验证或公开发表的文献数据结果进行比较，以确定每一种抗体的敏感性和特异性。

※ 预后及预测性标记物

上述所有的原则及措施均适用于IHC实验室对预后及预测性标记物的质量管理。不过，临床组织学实验室所做的IHC并非定量检测，虽然单克隆抗体与其靶抗原的结合可以进行化学计量，但IHC平台中过氧化物酶催化的酶反应及反应产物的沉积并不能很好的表征，且可能是非线性的。IHC动态范围有限，因此阻碍了靶抗原浓度的精确评估。尽管有人将IHC中的免疫化学反应和ELISA相比，后者的免疫实验基本上不受实验前处理条件的影响，且它可通过相应的标准曲线进行校准，但IHC不行。最近Taylor等人提出了IHC定量中的另一重要问题-组织学切片的厚度。除此之外，感兴趣的读者可以自行查阅ASCO/CAP指南、美国FDA相关指南以及最近关于这些指南的综合等，以进一步深入了解这些指标的质量管理。

（来源：Appl Immunohistochem Mol Morphol · Volume 23, Number 7, August 2015）