

· 专家论坛 ·

国际特设专家委员会建议:诊断免疫组化阳性对照标准化

刘 勇¹, 杨海玉²

关键词:免疫组织化学;阳性;标准化

中图分类号:R 446.6 文献标志码:A

文章编号:1001-7399(2016)01-0001-03

doi:10.13315/j.cnki.cjcep.2016.01.001

在临床病理诊断工作中,免疫组化检测是一种必不可少的技术手段,其染色结果是病理医师作出正确诊断的重要依据。免疫组化染色步骤繁多,一步操作不当就会影响染色结果,进而影响病理诊断的准确性。在免疫组化染色过程中设立对照是进行染色质量控制的重要措施之一,包括阳性对照和阴性对照。根据对照结果可以判断免疫组化操作步骤是否正确、使用试剂是否可靠,从而确保技术最佳化和结果的有效性。然而,长期以来国内外关于免疫组化对照的设立,缺乏认可的统一标准,使病理实验室之间的检测结果判断缺乏可比性。2015年,国际特设专家委员会对诊断免疫组化阳性对照标准化问题进行探讨,该次会议中,专家们就诊断免疫组化阳性对照的设置目的及原则、阳性对照类型及标准定义、阳性对照组织的选择及临床应用等方面达成专家共识,并推荐18种病理诊断常用抗体对照组织及其染色结果判断标准^[1]。现就该内容作一简介。

1 免疫组化设置阳性对照的目的及原则

免疫组化是利用已标记的抗体对组织细胞内相应抗原进行检测的一种常用技术。大多数的免疫组化目标是为了证实待检组织中是否存在目的抗原,而目的抗原的表达水平可以是低表达或高表达,也可以不表达。免疫组化设置阳性对照不仅用于证实目的抗原是否存在,还应根据对照组织提供的信息对抗原表达水平(弱~强)进行评估。免疫组化染色结果的判断包括定性和定量分析。定量分析:阳性对照必须提供已知的抗原蛋白表达谱,且能在其选择性组织结构中观察代表性的阳性反应,如临床上HER-2免疫组化染色通常要求定量分析,其结果常用“0~3+”表示,HER-2阳性对照则必须提供能代表“0~3+”染色结果的信息。另外,阳性对照必须提供的重要信息包括免疫组化染色的检测下限

(low limit of detection, LLOD),这也是判断染色是否成功的参照物。LLOD是指在已知的可低表达某一抗原蛋白的组织/细胞成分中观察的阳性反应,其设置必须遵循适用原则,如CD34已证实在骨髓造血干/祖细胞中高表达,因而在骨髓组织中检测CD34易获得阳性结果;然而,对于皮肤肿瘤来说,仅隆突性皮肤纤维肉瘤可表现CD34强阳性染色,而在其他类型的皮肤肿瘤中CD34表达较弱。因此,在检测皮肤肿瘤是否表达CD34时,如果采用骨髓组织作为阳性对照并设置其为LLOD,则很可能导致假阴性的判断,必须选择其他适宜组织作为对照。

2 免疫组化阳性对照的分类及优缺点

阳性对照包括内对照和外对照两种类型。阳性内对照是指存在于待检患者组织中的已知可阳性表达目的抗原的细胞/组织。目前认为内对照是最佳的对照类型,因为其存在于待检患者组织中,真正做到了待检组织和对照组织在相同条件下进行检测分析。因此,专家建议在解释免疫组化结果之前必须寻找并评价可能存在的阳性内对照。目前,专家推荐的4种常用病理诊断抗体的阳性内对照详见表1。虽然内对照非常重要,但其并不存在于所有患者组织中,即使存在也不能提供全面的信息(包括抗原表达、LLOD等),其临床应用受到限制。因此,即使存在阳性内对照的情况下,病理医师仍需结合其他对照类型判断染色结果。

阳性外对照是指与待检患者组织无关的已知可阳性表达目的抗原的细胞/组织/蛋白肽/类组织(histoid)。阳性外对照可来源于病理科归档的病理蜡块或诊断剩余的人体组织,也可来源于新型组织材料包括细胞株、重组蛋白等。阳性外对照的最大优点是可提供包括LLOD在内的较为全面的信息。国际特设专家委员会特别推荐18种常用病理诊断抗体对照组织(表2)。该推荐不仅明确了每一种抗体可采用的对照组织类型,而且详细描述这些组织中阳性染色细胞类型、细胞数量、细胞染色区域以及染色程度,特别是明确了判断染色是否成功的参照底限,即LLOD标准。然而,阳性外对照也有其缺陷,即通常情况下很难保证对照组织和待检组织能够在相同条件下进行处理。样本制备和组织固定是影响免疫组化染色结果的重要因素,其相关参数包括组织缺血时间、组织块固定厚度、固定剂类型、固定时间和温度等。因此,专家建议病理科在组织样本制备方面必须尽可能做到标准化,对于适宜的可用于对照的病理蜡块应分类保存备用,并仔细记录其组织处理相关参数。

收稿日期:2015-10-20

作者单位:¹江西省人民医院病理科,南昌 330006²江西省人民医院临床医学研究所,南昌 330006

作者简介:刘 勇,男,主任医师。E-mail: jxpathology@126.com

杨海玉,女,副主任医师,通讯作者。E-mail: yanghaiyu@

表 1 国际特设专家委员会推荐 4 种常用病理诊断抗体的阳性内对照

抗体名称	阳性内对照
CK5	正常前列腺腺体基底细胞呈阳性,可表现为从良性腺体(阳性)到恶性腺体(阴性)不同程度染色;如待检肿瘤组织不存在正常结构,则表现为完全阴性染色
错配修复蛋白(MLH1、MSH2、PMS2、MSH6)	正常结肠的腺细胞呈阳性,如在结肠癌或子宫内膜癌细胞中表达缺失则视为异常,患者应排除 Lynch 综合征
SMAD4/Dpc4	广谱表达,约在 55% 的胰腺癌中表达缺失
PTEN	广谱表达,表达缺失与肿瘤发生、进展及耐药相关

注:建议依据阳性内对照解释以上抗体的免疫组化染色结果

表 2 国际特设专家委员会推荐 18 种常见抗体对照组织及染色结果判断标准

抗体名称	对照组织	染色结果判断标准
CKpan	阑尾	几乎所有柱状上皮细胞均为中至强阳性胞质染色(可见膜深染)
	肝脏	绝大多数肝细胞至少显示弱至中度阳性胞质染色并伴膜深染(LLOD)
	扁桃体	所有鳞状上皮细胞均为中至强阳性胞质染色,CKpan 显示间质网状细胞呈弱至中度阳性胞质染色(LLOD)
CK8/18(低分子量 CK)	阑尾	所有柱状上皮细胞均为中至强阳性胞质染色(可见膜深染)
	肝脏	绝大多数肝细胞至少显示弱至中度阳性胞质染色并伴膜深染(LLOD)
	扁桃体	散在鳞状上皮细胞呈中至强阳性胞质染色(阳性细胞数因标本不同而异),CK8/18 阳性间质网状细胞呈弱至中度阳性胞质染色(LLOD)
CK5/14(高分子量 CK)	扁桃体	几乎所有鳞状上皮细胞均为中至强阳性胞质染色
	胰腺	闰管内散在柱状上皮细胞均为弱至中度阳性胞膜染色(LLOD)
	肝脏	均为阴性染色
CK20	阑尾	几乎所有表层上皮细胞均为中至强阳性胞质染色,绝大多数基底隐窝上皮细胞至少显示胞质弱阳性(LLOD)
	肝脏	均为阴性染色
	扁桃体	均为阴性染色
CK7	肝脏	几乎所有胆管上皮细胞均为中至强阳性胞质染色
	胰腺	几乎所有闰管上皮细胞均为弱至中度阳性胞质染色(LLOD)
	阑尾	通常呈阴性染色,散在柱状上皮细胞和内皮细胞可呈弱至中度阳性胞质染色
vimentin	阑尾	上皮内散在 T 细胞均为弱至中度阳性胞质染色,固有层大血管内皮细胞、间质细胞、巨噬细胞和淋巴细胞均为中至强阳性胞质染色
	肝脏	肝窦内所有内皮细胞和 Kupffer 细胞均为弱至中度阳性胞质染色(LLOD)
	胰腺	绝大多数外分泌腺泡上皮细胞均为弱至强阳性胞质染色
TTF-1	甲状腺	几乎所有上皮细胞均为强阳性胞核染色
	肺	几乎所有肺泡细胞和终末支气管基底细胞均为中至强阳性胞核染色,终末支气管柱状上皮细胞至少显示弱阳性胞核染色(LLOD)
	扁桃体	均为阴性染色
CDX-2	阑尾	几乎所有上皮细胞均为强阳性胞核染色,常可见弱阳性胞质染色
	胰腺	大多数闰管上皮细胞均为弱至中度阳性胞核染色(LLOD)
	扁桃体	均为阴性染色
CEA	阑尾	黏膜表层上皮刷状缘均为中至强阳性染色,几乎所有上皮细胞均为弱至中度阳性胞质染色(LLOD);如果 CEA 在腺癌组织中过表达,那么黏膜表层染色是染色成功的唯一参照底限
	扁桃体	散在鳞状上皮细胞呈中至强阳性胞质染色(阳性细胞数因标本不同而异)
	肝脏	均为阴性染色
CD31	扁桃体	绝大多数套区 B 细胞均为弱至中度阳性胞膜染色(LLOD)
	胰腺	几乎所有内皮细胞均为中至强阳性胞膜染色
	肝脏	几乎所有肝窦内皮细胞均为弱至中度阳性胞膜染色(LLOD)
α -SMA	阑尾	所有血管、黏膜肌层及固有肌层的平滑肌细胞均为中至强阳性胞质染色
	扁桃体	几乎所有血管平滑肌细胞均为中至强阳性胞质染色
	肝脏	大多数窦周细胞至少显示弱至中度阳性胞质染色(LLOD)
desmin	阑尾	黏膜肌层和固有肌层内所有平滑肌细胞均为中至强阳性胞质染色,大多数血管平滑肌细胞呈弱至中度阳性胞质染色(LLOD)
	肝脏	肝细胞均为阴性染色,血管散在平滑肌细胞可呈弱至中度阳性胞质染色
	扁桃体	上皮细胞和淋巴细胞均为阴性染色,血管散在平滑肌细胞可呈弱至中度阳性胞质染色
CD3	扁桃体	滤泡间 T 区所有 T 细胞和生发中心内散在 T 细胞均为中至强阳性胞膜染色
	阑尾	上皮内散在 T 细胞均为弱至中度胞膜阳性染色(LLOD)

续表

抗体名称	对照组织	染色结果判断标准
CD20	肝脏	散在 T 细胞至少显示弱至中度胞膜阳性染色 (LLOD)
	扁桃体	几乎所有生发中心 B 细胞和套区 B 细胞均为中至强阳性胞膜染色,浆细胞也呈一定程度的弱阳性
	阑尾	固有层散在浆细胞常呈一定程度的弱阳性胞膜染色 (LLOD)
Ki-67	肝脏	散在浆细胞均为中至强阳性胞膜染色
	扁桃体	几乎所有生发中心 B 细胞 (包括暗区和明区) 以及鳞状上皮基底旁细胞均为中至强阳性胞核染色
	阑尾	大多数基底柱状上皮细胞均为中至强阳性胞核染色
S-100	肝脏	大多数正常肝细胞均为阴性染色,散在中性粒细胞不应表现任何程度的胞核染色,只有炎症和反应性改变时才偶尔可见中性粒细胞阳性
	扁桃体	散在滤泡间区树突细胞均为中至强阳性胞核及胞质染色,如果采用 DAKO 公司的多克隆抗体,可见滤泡树突细胞呈胞质及胞核弱阳性 (LLOD)
	胰腺	大多数胰岛内分泌细胞均为弱至强阳性胞核及胞质染色,所有脂肪细胞均为阳性染色 (LLOD)
CgA	肝脏	肝细胞及胆管上皮细胞均为阴性染色,可见散在的树突状细胞阳性
	胰腺	大多数胰岛内分泌细胞均为中至强阳性胞质染色
	阑尾	大多数神经节细胞和轴突均为弱至中度阳性染色 (LLOD),神经内分泌细胞均为强阳性胞质染色
Syn	肝脏	肝细胞和胆管上皮细胞均为阴性染色,可见散在的周围神经轴突阳性染色
	阑尾	大多数神经节细胞和轴突均为中至强阳性染色;大多数杯状细胞均为弱阳性胞质染色 (LLOD)
	胰腺	大多数胰岛内分泌细胞均为中至强阳性胞质染色
	肝脏	肝细胞和胆管上皮细胞均为阴性染色,可见散在的周围神经轴突阳性染色

3 免疫组化阳性对照组织的选择及应用

归档诊断人体组织 (病理蜡块) 和诊断剩余人体组织是目前临床上应用最广泛的对照组织来源。但是,从多方面分析上述组织来源并非最佳,因为多数组织处理条件并不一致,且病理蜡块是医院必须保存的患者资料,取之用于对照非常有限。因此,提供足够的适宜对照组织是满足当前临床应用需求的困难所在。近年来,学者们一直致力于寻找新型对照材料,包括细胞株、蛋白肽、移植瘤组织和类组织等。未来采用新型组织材料作为诊断免疫组化对照的需求日益增多,这也是获取足量且稳定可控的对照组织来源之一。然而,新型组织材料在临床上推广应用的重要前提是需进一步明确其特性,并且建立可行的与人体组织标本处理相匹配的方法,从而使其更适于对照用途。

综上所述,评价免疫组化染色结果不仅要判断结果是否为阳性,还需关注阳性染色细胞类型、细胞区域以及染色程

度等信息。通常来说,一般的实验对照并不能提供免疫组化的全面信息。对照组织芯片一般是多组织设计,可包含高表达、低表达及不表达目的抗原的对照组织。将所有组织放在一个蜡块中构成一个芯片,这样既能保证组织处理的一致性,也可提供较为全面的信息,从而为免疫组化结果判断提供更可靠的依据。另外,在日常免疫组化检测中,待检组织和对照组织通常是分开放置于不同的载玻片上,造成了两者检测条件不能完全一致,且在观察结果时存在一定的不便。因此,专家推荐将待检患者组织和对照组织置于同一载玻片上,可最大程度确保检测条件的一致性。

参考文献:

- [1] Torlakovic E E, Nielsen S, Francis G, *et al.* Standardization of positive controls in diagnostic immunohistochemistry: recommendations from the International Ad Hoc Expert Committee[J]. Appl Immunohistochem Mol Morphol, 2015,23(1): 1-18.

· 简 讯 ·

敬告作者

本刊编辑部收到作者的投稿后,经初审符合本刊征稿内容者编辑部将及时发回执,注明稿件编号并通知作者交稿件处理费;对通过专家审核的稿件,在进行文字和撰写规范编辑加工后,发送“退修意见单”给第一作者;如作者的修回稿符合退修要求,则进入待用状态。编辑部将根据各期中心内容遴选稿件,并在排版后用 E-mail 发送校对样稿和缴纳版面费通知。编辑部咨询电话:0551-65161102,投稿邮箱:lcsybl@163.com。