



中华人民共和国国家标准

GB/TXXXXX—XXXX/ISO 20166-4:2021

分子体外诊断检验 福尔马林固定及石蜡 包埋组织检验前过程的规范 第4部分：原位检测技术

Molecular in vitro diagnostic examinations — Specifications for preexamination processes for formalin-fixed and paraffin-embedded (FFPE) tissue — Part 4: in situ detection technique

(ISO 20166-4:2021, IDT)

草案版次选择

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

XXXX-XX-XX 发布

XXXX-XX-XX 实施

国家市场监督管理总局 发布
国家标准化管理委员会

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。

本文件是GB/T XXXXX《分子体外诊断检验 福尔马林固定及石蜡包埋组织检验前过程的规范》的第1部分。GB/T XXXXX已经发布了以下部分：

- 第1部分：分离RNA；
- 第2部分：分离蛋白质；
- 第3部分：分离DNA。

本文件等同采用ISO 20166-4:2021《分子体外诊断检验 福尔马林固定及石蜡包埋组织检验前过程的规范 第4部分：原位检测技术》。

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。

本文件由国家药品监督管理局提出。

本文件由全国医用临床检验实验室和体外诊断系统标准化技术委员会（SAC/TC136）归口。

本文件起草单位：XXXXX

本文件主要起草人：XXXXX

引 言

目前分子体外诊断（包括分子病理学）在医学上取得了重大进展。并且随着用于分析的组织形态学和生物标志物（如人体组织和体液的蛋白质、DNA、RNA和/或代谢物（葡萄糖））的新技术出现，预计会有进一步的进展。

在病理学上，大多数诊断是基于福尔马林固定和石蜡包埋（FFPE）组织切片的原位染色。在个体化医学的背景下，在形态学评价的经典组织学染色（如苏木精和伊红）基础上，应用了越来越多的其他原位检测技术，如免疫组织化学或原位杂交，以及分离生物分子的分子分析。例如，许多监管机构批准的肿瘤辅助诊断是基于FFPE组织切片的原位检测技术。随着个性化医疗和新技术的发展，如多标记免疫染色和基于计算机的数字图像分析（如玻片扫描仪），对分析前程序的标准化提出了新的要求，以获得可重复的定性和定量结果。

在包括标本采集、组织处理、包埋、运输、储存、切片和原位检测预处理的检验前过程中，生物分子的图谱和/或完整性及其在组织原位检测的定位、数量和可检测性可能会发生巨大变化。这使得诊断或研究中原位检测的结果不可靠甚至不可能的，因为随后的检验将不代表分子的体内状态，而是代表检验前过程中产生的人为图谱或形态。

因此，需要通过使用不同的原位检测技术对FFPE组织标本的整个检验前过程进行标准化，以便对FFPE组织切片进行形态学和生物分子的原位检测。

有多项科学证据表明，检验前阶段的若干因素会影响原位检测的结果（如特异性或敏感性方面的质量或数量），从而对诊断结果产生重大影响。

本文件基于这些工作来组织和标准化福尔马林固定和石蜡包埋（FFPE）组织在各种原位检测中的步骤，即检验前阶段。本文件用于原位检测技术的检验前阶段，适用于原位检测技术的整个领域。

包括但不限于：

经典组织学染色，如苏木精-伊红染色（H&E）；

组织化学技术，如脂质染色，过碘酸雪夫染色（PAS），Perls普鲁士蓝反应，Feulgen反应，酶组织化学；

使用抗体（多克隆，单克隆或重组抗体）或其他亲和结合剂的免疫组织化学染色（IHC）或免疫荧光染色；

基于杂交的技术，如RNA或DNA原位杂交（ISH）技术（如荧光原位杂交（FISH）、显色原位杂交（CISH）或银增强原位杂交（SISH））；

可以定位到FFPE切片特定区域的分离生物分子的分子分析（如原位测序、成像质谱）。

分子体外诊断检验 福尔马林固定及石蜡包埋组织检验前过程的规范

第4部分：原位检测技术

1 范围

本文件提供了用于生物分子（如代谢物、蛋白质、DNA和/或RNA等）的形态和结构定性和/或（半）定量原位检查的福尔马林固定和石蜡包埋组织（FFPE）标本的检验前操作说明，包括采集、处理、记录、运输、储存及加工。

本文件适用于原位检测技术的体外诊断检查，其中包括由病理学实验室（组织病理学实验室）以及分子病理学实验室和其他医学实验室进行的实验室自建项目。它也适用于实验室客户、体外诊断开发商和制造商、生物样本库以及从事生物医学研究的机构和商业组织以及监管机构。

本文件不适用于从FFPE组织中分离的RNA、蛋白质和DNA的检验前阶段。ISO 20166-1、ISO 20166-2和ISO 20166-3《分子体外诊断检验——分离RNA、蛋白质和DNA检验前过程的规范》分别介绍了这些内容。

对细针吸取物（FNAs）的检验前过程采取了专用措施。CEN WI 00140128、CEN WI 00140126和CEN WI 00140129《分子体外诊断检查——从细针吸取物（FNA）分离的细胞RNA、蛋白质和基因组DNA的检验前操作规范》分别介绍了这些内容。

注：国际、国家及地区法规要求同样适用于本文件的特定主题。

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。

3 术语和定义

ISO 15189界定的以及下列术语和定义适用于本文件。

3.1

亲和性结合分子affinity binder

包括亲和体、多肽、抗体（3.3）片段或其他与生物分子（3.6）及细胞结构相互作用的小分子，可用于原位检测（3.27）技术。

3.2

环境温度 ambient temperature

未经调节的周围空气的温度。

（来源：ISO 20166-1:2018, 3.2）

3.3

抗体antibody

由B淋巴细胞产生和分泌的蛋白质（3.37）（免疫球蛋白），对被识别为外来（抗原（3.4））的分子作出反应，并能与该特定抗原（3.4）结合。

（来源：ISO 16577:2016, 3.10, 修改：删除了注释1）

3.4

抗原antigen

刺激抗体（3.3）产生并与之反应的物质。

（来源：ISO 15089:2000, 3.5）

3.5

抗原修复/表位修复antigen retrieval/epitope retrieval

通过中和福尔马林固定（3.19）、组织处理（3.47）和组织石蜡包埋（3.33）引入的修饰，暴露抗原（3.4）/表位（3.14），并恢复其与免疫组织化学（3.25）检测中所用抗体（3.3）结合的特性。

3.6

生物分子biomolecule

生物体内产生的有机分子，参与生物体的维持和代谢过程。

注：有机分子的实例为蛋白质（3.37）、碳水化合物、脂质或核酸。

3.7

清洗clearing

组织处理（3.47）过程中的一个步骤，将福尔马林固定的组织从脱水（3.10）试剂转移到清洁剂（例如二甲苯）中，以制备用于浸渍（3.26）的组织。

3.8

冷缺血 cold ischemia

组织自人体取出后至稳定或固定前的存在状况。

（来源：ISO 20166-1:2018, 3.5）

3.9

脱钙decalcification

使用化学试剂从骨或其他钙化组织中去除矿物质（无机钙）的技术，将硬组织成分调整到石蜡（3.32）的柔软度，以便切片。

3.10

脱水dehydration

将福尔马林固定的组织浸泡在一系列浓度不断增加的脱水试剂溶液中，最后用无水（100%）溶液处理，从而去除水分的组织处理（3.47）步骤。

3.11

偏倚deviation

偏离批准的说明、程序和/或方法或既定标准。

（来源：ISO 15378: 2017, 3.7.5, 修改：“批准（3.7.1）标准操作程序（SOP）（3.7.10）”替换为“说明、程序和/或方法”）

3.12

诊断diagnosis

从其体征和/或症状中识别健康或疾病状态，诊断过程可以通过各种检验(3.15)对个体状况进行分类，分成不同的类别或亚类，以便做出关于治疗和预后的医学决策。

（来源：ISO 20166-1:2018, 3.7）

3.13

DNA（脱氧核糖核苷酸）deoxyribonucleic acid

以单链(ssDNA)或双链(dsDNA)形式存在的脱氧核糖核苷酸聚合体。

（来源：ISO 22174:2005, 3.1.2）

3.14

表位epitope

抗原（3.4）生物分子（3.6）上的抗体（3.3）结合位点。

3.15

检验examination

分析检测analytical test

以确定一个特性的值或特征为目标的一组操作。

注：从使用抗体（3.3）、核酸探针或染料的原位检测（3.27）开始、包括各种用于定性或定量检验的参数测试或化学操作的过程。

（来源：ISO 15189:2012, 3.7, 修改：原来的注释1至3被删除，加入新的注释1，“分析测试”被添加为首选术语）

3.16

检验制造商（分析测试制造商）examination manufacturer/analytical test manufacturer
制造和/或生产特定分析测试（3.15）的实体。

3.17

FFPE组织（福尔马林固定及石蜡包埋组织）FFPE tissue

经福尔马林固定（3.18、3.19）、组织处理（3.47）和石蜡包埋（3.33）于组织盒的组织标本（3.36）/样本（3.42）。

3.18

福尔马林formalin

质量分数为37%的饱和甲醛水溶液（相当于体积分数为40%）。

（来源：ISO 20166-1: 2018, 3.11）

3.19

福尔马林固定formalin fixation

用标准缓冲福尔马林溶液（3.45）处理样本（3.42）使其稳定。

(来源: ISO 20166-1: 2018, 3.12)

3.20

福尔马林色素/酸性福尔马林血红素色素/酸性血红素 formalin pigment/acid formalin haematin pigment acid/hematin

黑色至棕色的无定形至微晶颗粒,从福尔马林固定组织中制备的组织切片中所含的人工颗粒。是由于该组织中甲酸浓度增加,甲酸作用于血红蛋白而产生。

3.21

取材/肉眼检验 grossing/gross examination

肉眼检查病理标本以获得诊断信息,同时进行进一步的显微镜下检验(3.15)。

(来源: ISO 20166-1:2018, 3.13)

3.22

组织化学技术 histochemical technique(s)

用于生物分子(3.6)可视化和表征的原位检测(3.27)技术,涉及与生物分子(3.6)中特定基团、自由基或化学键的化学反应,并提供生物分子(3.6)在组织切片(3.49)中原位定位的信息。

注:生物分子(3.6)的示例为碳水化合物、脂质、其他代谢物、蛋白质(3.37)、氨基酸、核酸、色素或酶等。

3.23

组织学染色 histological staining

原位检测(3.27)技术通过组织学染色(例如苏木精-伊红(HE)、嗜铬苯胺蓝(CAB))来制备组织切片(3.49),以突出组织切片(3.49)的特征并增强组织切片(3.49)的对比度。

3.24

均质 homogeneous

结构和组成一致。

(来源: ISO 20166-1:2018, 3.31)

3.25

免疫组化/IHC immunohistochemistry/IHC

原位检测(3.27)技术,利用抗体(3.3)与生物组织或细胞中的抗原(3.4)/表位(3.14)特异性结合的原理,使用明场显微镜观察抗原(3.4)(例如蛋白质(3.37))。

3.26

浸染/石蜡浸染 impregnation/impregnation with paraffin

组织处理(3.47)中的一个步骤,更换清洗剂和用熔融石蜡(3.22)渗透组织。

3.27

原位检测 in situ detection

在载玻片切片上精确定位特定生物分子(3.6)的技术。

示例:用于蛋白质(3.37)检测的免疫组化技术(3.25),用于核酸检测的原位杂交(3.30),组织学染色(3.23),组织化学技术(3.22),MALDI成像质谱,成像质谱,原位拉曼光谱。

3. 28

原位检测系统/检测系统in situ detection system/detection system

用于在组织切片（3.49）可视化分子与靶标结合的一组试剂。

注1：分子可以是抗体（3.3），亲和性结合分子（3.1）和核酸等。

注2：原位检测（3.27）最常见的是基于酶和荧光基团的检测系统。

3. 29

原位检验/分析性原位测试 in situ examination/analytical in situ test

基于原位检测（3.27）的检验（3.15）。

3. 30

原位杂交/ISH in situ hybridization/ISH

原位检测（3.27）技术，利用互补核酸探针与生物组织或细胞中的RNA（3.38）或DNA（3.13）片段特异性结合的原理，使用明场或荧光显微镜观察核酸（如DNA（3.13）或RNA（3.38））。

3. 31

不合格nonconformity

不满足要求。

（来源：ISO 9000:2015, 3.6.9, 修改：删除了注释1）

3. 32

石蜡paraffin/paraffin wax

从蒸馏物中获得的产品，主要由饱和烃混合物组成，在室温（3.41）下为固体，用于福尔马林固定组织标本（3.36）/样本（3.42）的石蜡包埋（3.33）。

3. 33

石蜡包埋paraffin embedding/embedding in paraffin

在组织处理（3.47）后进行的步骤，将组织样本（3.42）放入熔化的石蜡（3.32）中，获得坚硬的周围基质，以便可以切割出薄的显微镜切片。

3. 34

翻译后修饰post-translational modification

在核糖体完成蛋白质（3.37）翻译后，由酶催化蛋白质（3.37）的修饰，可以是向蛋白质（3.37）共价添加功能基团，例如磷酸化和去乙酰化。是蛋白质（3.37）功能成熟所必需的蛋白水解加工和/或折叠过程。

3. 35

检验前过程pre-examination process（统一按GB/T 22576.1-2018）

分析前阶段preanalytical phase

分析前工作流程preanalytical workflow

按时间顺序从临床医生的申请开始，包括检验（3.15）申请，病人的准备和身份识别，原始样本（3.36）的采集，运送到医学实验室和在实验室内进行运输，评估，组织处理（3.47），包埋，FFPE块储存（3.46）

和取出、切片（包括安装在载玻片上并干燥）、未染色载玻片组织切片（3.49）的储存（3.46）（如适用）和原位检测（3.27）技术的前处理步骤，并在分析检验（3.15）开始时结束。

注：原位检测（3.27）的检验前阶段包括影响预期检验（3.15）结果的准备流程，例如抗原/表位修复（3.5）和预杂交过程。

（来源：ISO 15189:2012, 3.15，修改：附加了一个术语，细节增多）

3.36

蛋白质protein

一种生物分子（3.6），由一条或多条通过肽键连接的氨基酸序列组成。

（来源：ISO 20166-2:2018, 3.14，修改：术语“生物大分子”替换为“生物分子”）

3.37

RNA（核糖核酸）RNA ribonucleic acid

以单链或双链形式存在的核糖核苷酸聚合物。

（来源：ISO 22166-1:2018, 3.20）

3.38

RNA图谱RNA profile

在没有任何损失、抑制或干扰的情况下测量的样本（3.42）中独立RNA（3.38）分子的数量。

（来源：ISO 20166-1:2018, 3.19）

3.39

RNase（核糖核酸酶）RNase ribonuclease

催化RNA（3.38）降解成更小组分的酶。

（来源：ISO 20166-1:2018, 3.21）

3.40

室温room temperature

本文件中是指18℃-25℃。

注：当地或国家法规可能定义不同。

（来源：ISO 20166-1:2018, 3.22）

3.41

样本sample

从原始样本（3.42）中提取的一个或多个部分。

（来源：ISO 15189:2012, 3.24，修改：删除了例子）

3.42

原始样本/标本specimen/primary sample

假定代表整体的，用于检验（3.15）、研究和分析的一种或多种数量或性质的体液、呼吸的空气、毛发或组织的离散部分。

（来源：ISO 15189:2012, 3.16，修改：此处使用的术语和定义没有原始注释）

3.43

标本容器specimen container

组织标本（3.36）收集后转移到其中进行进一步分析前工作流程（3.35）步骤（例如转移、固定）的容器。

3.44

稳定性stability

在特定条件下储存时，样本（3.42）材料在特定时间段内保持规定属性的能力。

注：本文件涉及的分析物是原位和组织内的生物分子（3.6）。

（来源：ISO 20166-1:2018, 3.24, 修改：重新定义了注释1）

3.45

标准缓冲福尔马林溶液/中性缓冲福尔马林/NBF standard buffered formalin solution/neutral buffered formalin/NBF

10%福尔马林（3.18）水溶液，即pH为 6.8-7.2、质量分数为3.7%（相当于体积分数为4%）的甲醛水溶液。

注：标准缓冲福尔马林溶液通常含有少量甲醇以抑制甲醛的氧化和聚合。

（来源：ISO 20166-1:2018, 3.25）

3.46

储存storage

在适宜的条件下维持生物材料的预期用途。

3.47

组织处理tissue processing

FFPE组织（3.17）形成包括四个连续步骤：组织固定、脱水（3.10）、清洗（3.7）和石蜡浸染（3.26）。

3.48

组织处理器tissue processor

用于组织固定、脱水（3.10）、清洗（3.7）和石蜡浸染（3.26）的自动化仪器。

（来源：ISO 20166-1:2018, 3.27）

3.49

组织切片tissue section

使用专用切片切割设备（即切片机）切割组织产生的非常薄的组织片。

注：使用切片机切割FFPE组织（3.17），生成薄片（ μm ），将其安装在载玻片上，用于原位检测（3.27）技术。

3.50

验证validation

在提供客观证据的整个过程中，确认已满足特定预期用途的要求。

注：“经验证的”用于指代相应的状态。

（来源：ISO 9000:2015, 3.8.13, 修改：删除了注释1至3）

3.51

确认verification

通过提供客观证据，确认已满足特定要求。

注1：术语“已确认的”用于表示相应的状态。

注2：确认可以包括以下活动：

进行替代计算，

将新的设计规范与类似的经验证的设计规范进行比较，

进行测试和演示，以及文件发布前审核。

（来源：ISO 9000:2005, 3.8.4）

3.52

热缺血warm ischemia

失去正常血液供应的组织从身体内移除前的状态。

（来源：ISO 20166-1:2018, 3.29）

3.53

工作流程workflow

完成任务所需的一系列结构化的活动。

（来源：ISO 20166-1:2018, 3.30，修改：增加了“结构化的”）

4 一般注意事项

关于医学实验室质量管理体系的一般说明，特别是标本采集、接收和处理（包括避免交叉污染）参见ISO 15189、ISO/IEC 17025或ISO/IEC 17020。ISO/TS 20658和ISO 20387（样本库）也适用。有关实验室设备、试剂和消耗品的要求应遵循ISO 15189。ISO/IEC 17025或者ISO/IEC 17020也适用。

检验前，检验和检验后过程的所有步骤（即整个工作流程）都会影响诊断或研究的结果。因此，应验证和确认整个工作流程。具体来说，这包括检验前的所有过程，例如检验申请、患者准备和识别、原始样本的采集、运输到实验室及在实验室内运输、固定、处理、包埋、切片和储存。

当分析前的工作流程不被控制时（如手术过程造成的热缺血持续时间和状况），应予以记录。应对分析前工作流程进行风险评估，包括其对分析测试性能的潜在影响，并应建立缓解措施以实现所需的分析测试性能。

注1：正常血液供应的中断因情况而异。因此，热缺血持续时间及其影响取决于具体情况，也可能取决于动脉血液供应的解剖结构。

在将组织固定在标准缓冲福尔马林溶液之前，生物分子的原位/亚细胞定位、数量、构象和结合状态可能会发生变化，例如生物分子降解、洗涤、交联和随后的合成改变（例如基因诱导、基因下调、RNA降解、蛋白质翻译后修饰的变化以及生化途径和能量状态的变化）。这些效应取决于热缺血和冷缺血的持续时间，以及福尔马林固定前的环境温度。此外，在不同患者/供体的组织中效应可能有所不同。

一般来说，组织标本固定前的热缺血和冷缺血持续时间越长，环境温度越高，生物分子图谱和原位/亚细胞定位发生变化的风险就越高。

注2：生物分子的数量、修饰和原位/亚细胞定位也可能有所不同，这取决于组织的来源和类型、潜在疾病、手术程序、药物治疗方案以及用于麻醉或治疗伴随疾病的药物、以及组织自体内取出后所处的不同环境条件。长时间的冷缺血导致蛋白质和磷酸化蛋白含量的变化[5, 6, 48]。将标本低温（如4℃）保存能够减弱这种影响[7]。RNA图谱可能会发生显著变化（例如基因诱导、基因下调、RNA降解）[8, 9]，这取决于热缺血和冷缺血持续时间以及福尔马林固定前的温度。较长的热缺血和冷缺血持续时间所导致的DNA、序列或拷贝数的改变（例如比较基因组杂交（CGH）图谱）是未知的[10]。DNA甲基化模式会随着缺血而改变[11]。

在相关情况下，应记录热缺血持续时间（如大肿瘤切除）。如果无法避免冷缺血（如福尔马林固定前向实验室运输的过程），应记录其持续时间，并记录标本容器周围的温度。

福尔马林固定（包括福尔马林溶液的质量、样品体积与福尔马林溶液体积的比率、固定的持续时间和温度）和其他检验前过程会影响形态学[12]，引起生物分子的修饰，并导致影响原位检测结果的次优分析测试性能。这些检验前过程包括组织处理[13]、FFPE组织块的储存[13]、切片（包括载玻片类型的选择、切片厚度、干燥和未染色载玻片组织切片的储存）。在原位检测试验的质量控制和应用中应考虑到这一点。如需减少此类问题对原位检测试验的影响，可优化FFPE组织的分析测试和/或载玻片固定FFPE组织切片的预处理（例如抗原修复，预杂交；见6.10.3）。

由于分子变性[14]、蛋白质交联、表位丢失或“掩蔽”、抗体与表位结合的空间位阻干扰[3, 15]，导致FFPE组织中的免疫反应性改变或丧失，会影响免疫组化。有证据表明，多数抗原（表位）即使不能完全恢复，也可以通过抗原修复得到基本恢复[16, 17]。因此，可以进行抗原修复以恢复FFPE组织中的免疫反应性和/或通过福尔马林固定、组织处理和包埋来“回收”被“掩蔽”或修饰的表位。由于最佳的抗原修复程序取决于所采用的分析前条件，因此应在整个分析前和分析工作流程中验证抗原修复要求。

注3：广泛的抗原修复可引起形态假象。

原位杂交会受到生物分子特性（如核酸完整性，核酸-核酸相互作用或核酸-蛋白质相互作用）的影响，可以采用针对特定分析前条件进行优化的预杂交程序来逆转这种影响。因此，应在整个分析前工作流程验证预杂交程序的要求。

在整个检验前过程，应采取预防措施避免不同标本/样本之间的交叉污染（如在可行的情况下，使用一次性材料或在处理不同标本/样本之间进行适当的清洁程序），并避免标本/样本混在一起。

应制定并遵守整个检验前过程的安全说明。标本采集、运输和处理的安全要求应符合相关ISO标准，如ISO 15189和ISO 15190。

如果由于不满足患者需求而未按照制造商的说明使用商业产品，则实验室应验证并确认其预期用途。其使用的责任和风险由用户承担。详见附件A。

5 实验室外

5.1 标本采集

5.1.1 概述

标本采集应考虑预期检验的要求（如疾病状况，标本大小）（参见Clause 6）。

实验室应与临床/手术室和医生合作，制定患者/标本供者所需文件、标本收集、标本容器的选择和标签以及标本运输程序的说明。

参见ISO 15189。

5.1.2 标本供者/患者的信息

应该包括标本供者/患者的身份信息，其形式可以是姓名或代码。

应包括但不限于：

- 标本供者/患者的相关健康状况，例如健康状况、疾病类型、伴随疾病、人口统计信息（如性别、年龄）；
- 组织采集前的常规医学治疗和特殊治疗信息，例如麻醉剂、药物、外科手术或诊断程序；
- 标本供者/患者的知情同意。

5.1.3 标本信息

应包括但不限于：

- a) 手术标本：根据检验需求，可通过将缺血相关的血管结扎/钳制时间点（通常为动脉钳制时间）记为体内缺血（热缺血）开始，以切除标本并从体内取出为结束（见 6.6），从而计算出热缺血持续时间。为了记录热缺血持续时间，需与手术室工作人员合作；

注：活检组织的热缺血可忽略不计。

- b) 尸检标本：估计的死亡时间点（用于确定尸检间隔）；从体内取出组织的时间点和日期[以计算冷缺血持续时间，最后以固定开始结束（见 6.2）]，以及取出方法（例如，芯针活检、切除、采集用活检装置）；
- c) 组织类型和来源、组织状况（如病变、未病变）的描述，包括外科医生、放射科医生或病理学家在手术室内外所做的任何标记；文件还应包括负责标本收集的人员身份（如姓名或代码）。

5.1.4 标本处理、储存及运输前准备

应执行以下步骤：

- a) 将标本从体内取出后，记录对其进行任何添加或修改，例如用于样本定向的标记（例如：油墨标记、缝线）、切口、避免标本干燥的措施（如用等渗缓冲液保湿以防止标本表面干燥）；
- b) 根据适用的运输法规选择和使用用于运输的标本容器和包装袋（如可密闭容器、真空包装、冷却箱、储运箱），所使用的标本容器应能安全关闭。当使用预先装有标准缓冲福尔马林溶液的标本容器时，应遵循制造商的说明；
- c) 选择和使用福尔马林固定程序（如 6.2 所述），或在实验室内对组织进行福尔马林固定时，选择和使用稳定程序（如真空包装、冷却方法）进行运输；根据 6.2 所述，如果福尔马林固定在实验室外开始，则应记录时间和日期；

注：当组织解冻后，意外地冷冻组织（如错误地使用冷藏包）可能会导致生物分子降解及影响生物分子形态特征；

- d) 标本容器的标签[例如患者 ID，注册号，医院入院号，样本类型及数量，器官组织来源]和附加记录信息[5.1.2, 5.1.3, 5.1.4 a)–c)中规定的信息]。应将两个患者标识视为正确识别患者/标本供者所需的最少信息量。标本容器的标签[例如使用自粘标签，手写体，射频识别设备（RFID），预先贴标签的容器，条形码]，应确保标本或样本的可追溯性。

标本从体内取出后，应立即转移到标本容器中。然后维持容器温度在2℃~8℃，最大限度地减少形态和/或生物分子的变化。

来自同一患者/供体的、具有相似特征（宏观外观，组织类型，疾病状态和解剖位置）的几个标本可以放入一个标本容器/容器隔室中。

应监控和记录标本容器周围的温度（例如不同房间储存的温度、运输温度；参见5.2）。如果无法测量温度，则应估算温度并记录下来（如环境温度，室温或2℃~8℃）。

5.2 运输要求

在标本尚未放入标准缓冲福尔马林溶液之前，应立即置于湿冰上或维持温度在2℃~8℃情况下进行运输，以尽量减少形态和生物分子的变化。

注：有证据表明，在将样本保存于生物库或用于组织病理学评估之前，在运输过程[18]中将样本置于4℃真空塑料袋中，可以稳定组织形态和生物分子。

如果标本在实验室外已经放入标准缓冲福尔马林溶液中，运输过程中的温度不应超过室温。

以适当的方式监控和记录温度（例如通过温度记录仪进行）（参见5.1.4）。

与说明的任何偏离均应加以描述并形成文件。

6 实验室内

6.1 标本接收

应记录标本接收人员的身份信息（如姓名或编号）。

记录标本到达的日期和时间，检查和记录所接收标本状况（例如标签、包括温度在内的运输条件、组织类型和标本数量、容器泄漏或破裂）。

与既定运输程序的任何偏差都应记录在案（参见5.2）。应制定处理不合格事件的程序。另请参阅ISO 15189相关信息。

6.2 福尔马林固定标本/样本

本步骤适用于标本和从一个标本中取出的一个或多个部分。

固定剂选用标准缓冲福尔马林溶液。

注1：在某些国家，标准缓冲福尔马林溶液也称中性缓冲福尔马林（NBF）。

至少每周检查一次标准缓冲福尔马林溶液的pH值，并且在使用前和新配制批次都应检查其pH值。

注2：福尔马林不稳定（如甲醛可以氧化为甲酸）[19]。

注3：使用存放时间过久的福尔马林溶液会导致甲酸的形成，从而降低pH值。并可能导致福尔马林色素，其在组织学切片中以黑色至棕色的无定形至微晶颗粒形式存在，是由酸作用于血红蛋白产生的[20]。

应执行以下步骤：

a) 记录将组织标本或样本放入标准缓冲福尔马林溶液中的时间点（以便于计算总固定持续时间，该时间以组织处理期间将样本转移到脱水试剂为终点；参见6.6）；

注1：福尔马林固定的总时间可能会影响进一步的检查，例如免疫组化技术[21]、基于核酸的分子检查[22, 23]。最佳福尔马林固定时间可能因组织类型和大小而异[48]。对于较大的手术标本，例如切除的肝脏，由于甲醛从组织表面渗透到内部，在肉眼检验之前可能会出现固定不均匀。

注2：对于手术标本，使用福尔马林固定超过24h导致交联强度升高，这可能会影响抗原决定簇的原位检查（例如免疫组化）[24]。在许多情况下，抗原修复可以逆转这些作用[17]，但是广泛的抗原修复也会导致人工伪像（例如非特异性、假阳性染色及形态学）。

注3：由于福尔马林固定开始于组织边缘，过短的福尔马林固定（在固定状态下）会导致福尔马林和酒精的混合固定。在组织处理过程中，未固定的组织中心会因酒精（凝结）而发生固定[25]。

注4：制造商的安全数据表（MSDS）包含处理标准缓冲福尔马林溶液的重要信息。

注5：甲醛是一种致癌的、有害的化合物，可以穿透组织并对生物分子进行化学修饰，其对于身体不同部位的危害分级可能不同。

b) 选择用于固定的容器

1) 用于标本/样本固定的容器的容量应保证标本可以完全浸没在标准缓冲福尔马林溶液中。并且标准缓冲福尔马林溶液用量与组织的比例至少为10:1（体积比）[10]。如果原始标本容器的容量未达到10:1的体积比，则应将标本转移到更大的容器中，以达到该比例。更换的较大容器的标签应与原始样本容器的标签相同。标签可以采用独特的实验室标本识别号（病理病例号）；

注1：用于原位RNA检验的标本，通常使用15:1~20:1（体积比）[47]。

注2：有证据表明，在使用适当的装置或适当的取材时，可以采用较低的福尔马林与组织体积比（例如2:1或1:1）[26-28]。

2) 对于较大的标本，为确保其完全被福尔马林固定，应进行特殊的组织处理方法，如实体器官的切口（如二等分）或中空器官的开口。在这种情况下，应定期更换标准缓冲福尔马林溶液；

3) 应遵循制造商的说明使用预先装满标准缓冲福尔马林溶液的标本容器；

4) 用于固定的标本容器应能安全关闭。

c) 应记录福尔马林溶液的组成、福尔马林固定方法（如浸泡固定或超声组织固定）和使用条件（如持续时间、温度）。

注：传统的浸泡固定通常在环境温度下进行。福尔马林注射、灌注及超声后有明显的免疫组化染色优势[24, 29, 30]。

6.3 标本的病理学评估和样本的选择

6.3.1 概述

应参照当地、国家或地区的法规。

需进行组织病理学诊断的离体组织标本的病理学的评估和记录以及从标本中选择用于进一步加工的样本应由具有行医资格的病理学医生（如获委员会认证的）完成，或在其监督或负责下完成。

注：特别是在疾病状况下，组织的分子特征通常不是均匀分布的。如在肿瘤的中心和浸润边缘可以激活不同的分子机制，并且肿瘤可以由不同分化等级的区域组成。

6.3.2 宏观评估

在福尔马林固定之前和/或之后对手术标本进行宏观评估时，应检查患者/供者身份信息（如姓名或编号），患者/供者的出生日期，住院号和/或病理学病例号及标本的临床信息（例如类型，大小，数量）（见5.1.2和5.1.3）。

手术标本和所有宏观发现应根据各自医学会（如病理学学会）的说明，并结合临床信息和问题（如病历或临床医生的要求）进行适当描述。应描述标本的解剖学定位。必要时可标记切除边缘和其他重要区域，有助于以后的显微镜检查。以上应记录在案。

注：上述评估或记录也可在实验室外进行，如手术室。

6.3.3 样本的选择

应由具有行医资格的病理学医生（如获委员会认证的）或在其监督下为形态学、生物分子的原位检测以及进一步研究目的选取合适的标本部分。原位检测的代表性样品应根据各医学会的器官/疾病特定说明进行采集（即取样），并记录在案。此外，对于某些原位检测技术（如免疫组织化学），应尽可能从含有肿瘤和邻近非肿瘤组织的肿瘤边界采集样本。

注1：根据地方规定，病理学专家也可在实验室外（如手术室）选择合适的标本部位（参见5.1.3）。

如果从体内取出的组织标本不需进行组织病理学诊断，那么该标本的评估及记录、样本的选择与记录可以由病理医生以外、其他具有资格的人员完成。

应将照片和示意图记录在案。

样本的大小应与组织盒相适宜（最大约为3cm x 2cm x 0.5cm）。

如果标本和所选样本尚未用福尔马林固定，则应立即将其放入标准缓冲福尔马林溶液中，并按6.2所述步骤进行。

如果标本在实验室外，已被放置于福尔马林中（见6.2），则应将所选样本转移到组织盒中，并立即转移到标准缓冲福尔马林溶液中，以避免样本干燥。如果所选样本尚未固定，则应在福尔马林中进行后固定，这可以在组织盒内进行。

当将从标本中取出的样本转运入组织盒时，应记录转运时间点。组织盒中一个或多个样本（如淋巴结）的定位说明应到位并遵循。

注2：原位检测的样本在组织盒和包埋模具中的方向决定了样本的哪个部分首先被制成切片。将感兴趣的组织表面放置在盒中进行固定，并且当将组织放置在包埋模具中进行包埋时保持该方向。如果将多个组织（例如不同水平的前哨淋巴结）放入一个固定盒中，并放入模具中进行包埋时，放置位置通常与组织病理学诊断有关。

每个组织盒贴有唯一标识符（如病理病例号、盒号、组织缩写）。在后续所有程序中，不可擦除标识符。唯一标识符应可被人识别，并可辅以由自动打印机手动或电子打印的条形码。

唯一标识符的最少应包括：实验室标本识别号（病理病例号）——包括年份、节段类型（手术、细胞学等）；标本标识符——字母或数字；块标识符——字母或数字。

可以使用其他标识符（例如实验室名称或标识符，用于区分不同组织类型、固定剂和/或病理信息的彩色编码暗盒）。

如果将从同一标本中取出的多个样本装在同一组织盒中，并且这些样本具有不同特征（如组织类型、疾病状态、定位），则应记录在案。

6.4 术中冷冻样本的后固定

必要时，可将冷冻标本（如进行冷冻切片诊断后）放入标准缓冲福尔马林溶液中进行后固定，以备随后进行石蜡包埋（如6.2所述）。

如果FFPE样本/标本来源于冷冻组织，则应记录在案。

术中检验所用的残余组织应加工成石蜡切片，与冷冻切片结果进行比较。

6.5 样本脱钙/软化

一些样本，如骨、含骨或其他钙化的（如肿瘤）或较硬的（如角化）样本可能需要脱钙或软化，以获得足够质量的FFPE组织切片用于原位检测技术。

脱钙和/或软化应根据制造商说明或基于验证和确认程序的书面说明进行。说明应包括但不限于脱钙剂/软化剂的类型和浓度，以及脱钙/软化的温度和持续时间。应将进行脱钙和/或软化的样本记录在案。

注意1：有证据表明脱钙程序会对原位检测造成影响[24, 31–33]。使用不同脱钙试剂（如强无机物（如盐酸）或弱有机酸（如甲酸））的不同脱钙方法（如在烘箱/水浴中培养或超声波加速）会对原位检测技术造成不同的影响[24, 30]。脱钙是在福尔马林完全固定后、组织处理和包埋前进行的。

如果在福尔马林固定后进行脱钙，应记录组织从福尔马林溶液转移到脱钙使用的第一种试剂（如脱钙剂或洗涤液）的日期和时间点，以便计算总固定时间。

如果标本在脱钙后再次转移到福尔马林中，该时间点被记为继续固定的开始时间。

注意2：某些脱钙剂可能需要先将福尔马林洗净后再转移到脱钙剂中，另一些则需要先将福尔马林洗净后再转移到脱水剂中（如将EDTA脱钙的组织样本直接放入70%（体积）的酒精中会导致EDTA沉淀）[34]。

6.6 组织处理及石蜡包埋

6.6.1 概述

组织处理应包括：脱水、清洗、石蜡浸渍等步骤，然后进行石蜡包埋。有些经验证的操作说明不包括清洗步骤。

注1：组织处理和石蜡包埋可影响已固定组织的形态和生物分子完整性。尤其是组织处理不充分（例如脱水不足、石蜡浸渍不完全）会导致组织伪像并损害原位检测（例如染色弱、降解导致抗原丢失、非特异性反应[24]）。

组织处理应该在自动组织处理器中进行。如果手动进行组织处理（这与原位检测制造商的说明并不矛盾），则应遵循实验室自建的经验证和确认的程序。

应存在组织处理和石蜡包埋的书面流程，并指明方法（如手动或自动）、仪器（如组织处理器和组织包埋器的类型）、试剂（如脱水剂和石蜡的类型）和步骤/程序（试剂的使用顺序、浓度、持续时间和温度）。在没有制造商说明或其他正当理由的情况下，应按照原位检测制造商说明或经实验室验证和确认的程序进行，并进行记录。附录B提供了指南示例。

应记录标本或样本从福尔马林转移到脱水剂（如含酒精溶液）的时间点和日期，以计算总固定时间。

根据组织处理器制造商的说明进行自动组织处理时，需定期更换所有试剂，并应记录在案（包括更换日期和更换的试剂类型）。

注2：组织处理过程中的脱水剂和清洁剂被先前步骤的残留物稀释，会导致从组织中去除水分的效率降低。特别是

在储存期间，若组织中残留的水分不能被石蜡替代，组织则易降解[10, 35]。更换间隔取决于组织处理的次数和上一次更换的日期。

注3：有的组织处理器具有自动试剂管理系统，用于测量试剂量并提示用户已达到试剂的浓度阈值；有的组织处理器利用升高温度和/或微波能量减少处理时间。

6.6.2 脱水和清洗

脱水应使用一系列浓度逐渐增加至无水试剂（100%）的脱水剂（例如乙醇）溶液（见附录B）。

注1：在组织处理过程中，通常使用乙醇作为脱水剂取代组织中的水，导致组织脱水。由于脱水和清洗不完全而产生的残余水分会影响组织（包括生物分子）在储存期间的质量和稳定性[10, 13, 25, 35]。

注2：可以使用酒精或非酒精脱水剂（如乙醇、异丙醇、甲醇、乙二醇和变性醇），不同脱水剂可能对原位检查产生不同的影响[24, 36]。

注3：脱水过度会导致组织收缩，使组织变硬变脆；长时间暴露于大多数的清洁剂会导致组织变脆[36]；快速脱水（如不采用浓度递增的脱水剂）可促使组织/细胞变形。

6.6.3 石蜡浸渍和石蜡包埋

石蜡的种类、浸渍和包埋的时间和温度会影响生物分子质量。应使用成分标准化、熔化温度低的石蜡。

注1：通常石蜡低熔化温度为50℃~56℃之间。有证据表明，高熔点（65℃）聚合石蜡可以影响原位检测（如IHC）[24]。

石蜡包埋的书面步骤（见6.1.1）应说明标本/样本在组织盒中正确定位。

注2：标本/样本在组织盒中的方向不正确会导致在切片过程中遗漏或损坏诊断上重要的组织元素。它还会影响切片的难易程度，从而影响组织切片的质量。

注3：某些组织可能需要特殊定向（如血管等管状结构，需切割管腔横截面；，如皮肤或肠等上皮组织，需切割所有相关层，并避免在切片过程中压迫组织）。

注4：在组织处理和包埋过程中，可使用相关产品（如凝胶、海绵、垫、纸）稳定标本/样本在组织盒中的位置和方向。

含有包埋组织的组织盒应通过适当方法（例如包埋用冷板）快速冷却。

注5：石蜡的快速冷却可确保形成小的晶体结构，进行FFPE组织切片时会产生较少的人工伪像[36]。

6.7 FFPE 组织块储存

已包埋的、福尔马林固定的组织完全冷却后，可以直接切片（见6.8）进行后续原位检测或存储。

FFPE组织一般存在多种储存方式，例如以FFPE组织块形式储存、或以（置于载玻片、未染色）切片形式储存（见6.8）[37]。

FFPE组织块的储存时间及条件（例如湿度，温度，暴露于氧气）会随着时间的流逝而对原位检测结果产生影响[13, 37, 38]。虽然存储几乎不影响形态，但随着存储时间的增加，生物分子的完整性、免疫反应性和核酸原位杂交信号会降低，特别是多年储存的FFPE组织块[13, 24, 38]。

为了减少对于生物分子完整性、免疫反应性和核酸原位杂交信号的影响，FFPE组织块应在室温或最好在较低温度下干燥保存[46]。

注1：较低的储存温度（例如2℃至8℃、-20℃）可减缓RNA [39, 40, 46]、DNA和蛋白质的降解以及免疫反应性随着时间的流逝。

注2：如果未将FFPE组织干燥储存和/或组织处理不充分，可能会增加生物分子的降解和免疫反应性的丧失，并且会刺激真菌和细菌的生长。

注3：用石蜡覆盖切好的FFPE块有利于长期储存。

应建立一个系统用于长期保存FFPE组织。储存位置、储存温度、样本/标本的取出、样本/标本的用途、样本/标本的归还都应记录在案。

6.8 FFPE 组织块的切片及载玻片切片的储存

免疫组化和原位杂交的FFPE切片应新鲜切取，如果无法避免存放载玻片切片，则应将其干燥存放在4℃或更低的温度。不得超过原位检测制造商说明书或实验室说明书中规定的总储存时间限制。应记录应用的储存条件（如湿度、温度、防止暴露于氧气的措施（例如在氮气下储存或用石蜡覆盖））。应记录储存开始日期（即切片/黏附在载玻片日期），以便计算总储存时间。

注1：将切片暴露于空气可导致生物分子氧化，从而导致抗原改变。

注2：未染色切片在储存期间比FFPE块更容易发生生物分子降解；载玻片未染色FFPE切片的保存会影响抗原的免疫组化染色。并非所有抗原因抗原衰变都受到一样的影响，大多数抗原保存1个月~2个月没有不利影响，然而某些抗原保存1周~3周后，会削弱检测能力[24]。

载玻片的类型（如电化载玻片、黏附载玻片）、FFPE组织切片的厚度、干燥（如持续时间、温度及方法）和未染色载玻片的储存（如持续时间、条件）都可能影响原位检测的结果[24, 30]，并应符合原位检测制造商的说明。如果不具备原位检测制造商的说明，或者未解决上述所有因素，则实验室应验证和确认程序，并提供及遵循书面说明。

如果由原位检测的外部人员切割切片，则应提前阐明诸如载玻片类型和粘合性、切片厚度或原位检测方法对切片储存时间的敏感性等问题。

在条件允许时，载玻片上应清楚地标明组织盒上的信息，并附加染色/检测系统上的信息。如果从一个FFPE块上切下多个部分并安装到不同的载玻片上，则这些切片的顺序应包括在标签中（即载玻片号）。一张载玻片只能放一名患者的切片。这不适用于对照切片。

标签应与预期的原位检测兼容（如能经受原位检测期间使用的试剂和温度）。如果要对染色的切片进行数字化处理，则载玻片标签应为人和机器可识别的（如条形码）。应在切片时进行标记，并与相应FFPE组织块的标签相匹配。

RNA原位检测技术要求与组织切片接触的设备（如切片机刀片、载玻片）和试剂（水浴箱中的水）不含RNase。

切片前应对FFPE组织块进行修剪。

用于原位检测的切片厚度应符合原位检测制造商或实验室说明书的规定。

注3：常用切片的厚度为2 μm~5 μm，部分原位检测技术和/或组织类型可能需要其他厚度。FFPE组织块温度，旋转速度，间隙角设置等因素会影响所达到的实际厚度。

切片机的维护或服务应定期进行并记录在案（包括但不限于所服务的仪器和服务日期）（请参阅ISO 15189）。

水浴箱的水温应比石蜡的熔点低5℃至10℃，并避免过热。应将使用前温度记录在案。水浴箱应在每块组织块（如：组织薄片）孵育之后进行清洁，以除去组织碎片和碎屑。

在使用时，如果将FFPE组织块浸泡在可能影响原位检测的液体（例如用于表面脱钙或组织软化的液体）中，应进行记录。

应记录载玻片FFPE组织切片的干燥温度、持续时间和方法（例如烘箱干燥，（强制）风干，自动染色机干燥模块）。

注4：干燥温度和持续时间会根据组织的类型有所不同。原位检测技术的建议干燥时间/温度为60℃处理1小时。已证明温度高于68℃会降低IHC染色强度[24]，导致形态改变（如核）或生物分子丢失（如脂肪）[41]。

6.9 载玻片切片的脱石蜡和再水化

载玻片固定的组织切片应在原位检测前不久进行脱石蜡处理，或在必须进行的预处理之前（参见第6.10节）（如IHC的抗原修复或ISH的预杂交）进行脱石蜡处理。鉴于原位分析测试的不同分析性能，可

能需要对脱蜡切片进行再水化（如用组织学染色液染色或用抗体孵育）或省略再水化（如某些原位杂交试验）。如果需要再水化，则应在脱蜡后直接进行。

如果原位检查制造商提供了脱蜡和再水化说明，则应遵循。

如果原位检查制造商未提供脱石蜡和再水化说明，实验室应根据检验性能规范制定并验证其自身的脱石蜡和再水化说明。这应包括但不限于试剂类型、方法（如手动、自动）、装置（如烘箱、自动染色机）、持续时间和温度。应提供并遵循书面和必要的图示说明。

注1：自动染色机搭载多种功能，可用于载玻片切片的干燥、脱石蜡和再水化。

注2：不完全脱石蜡会影响某些原位检测技术[42]，脱蜡过程中的高温也会对某些原位检测技术造成影响。

6.10 用于原位检测技术的载玻片切片的预处理

6.10.1 概述

一些原位检测技术和分析测试可能需要对载玻片上脱石蜡和再水化的FFPE组织切片进行预处理，以逆转福尔马林固定、组织处理和包埋造成的修饰（例如暴露抗原/表位和靶核酸）。预处理往往整合在原位检测技术中。

6.10.2 基于抗体或其他亲和结合剂的原位检测技术的预处理

对于基于抗体或其他亲和结合剂的原位检测技术（如免疫组化、免疫荧光染色），预处理可能包括抗原修复（如热诱导表位修复（HIER））。

如果原位检查制造商提供了关于抗原修复的说明，则应遵循这些说明。

如果原位检查制造商未提供关于抗原修复的说明，则检验实验室应设计、指定、开发、验证和确认程序。这应包括但不限于抗原修复的类型（如热诱导或蛋白水解诱导的抗原决定簇修复），设备（例如所使用的自动染色机、微波炉、水浴箱和压力锅）以及抗原修复的试剂（例如缓冲液的类型和pH、酶的类型和浓度），持续时间和条件（例如持续时间、温度和瓦特）[3]。应为每个分析测试制定有关预处理程序的说明并遵守。

应将所应用的预处理程序记录在案。

6.10.3 基于杂交的原位检测技术的预处理

对于基于杂交的原位检测技术（如荧光或显色原位杂交），预处理包括组织和细胞的透化、靶标的暴露和封闭（也称为预杂交）。

如果原位检查制造商提供了关于预处理的说明，则应遵循这些说明。

如果原位检查制造商未提供关于预处理的说明，则检验实验室应设计、指定、开发、验证和确认程序。应包括但不限于预处理试剂（如酶和缓冲液的类型和浓度）、步骤、持续时间、温度和装置。应为每个分析测试制定有关预处理程序的说明并遵守。

应将所应用的预处理程序记录在案。

6.10.4 其他原位检测技术的预处理

在经典的组织学染色和组化技术之前通常无需任何预处理。其他原位检测方法，例如可以映射到FFPE切片特定区域的生物分子的分子分析（如原位测序、成像质谱分析）可能需要对组织切片进行特殊预处理。

6.11 原位检测分析前阶段的质量评估

质量评估应遵循检验制造商的说明。如果说明未包含有关质量评估的信息，则实验室应制定并验证质量评估程序。质量评估可包括但不限于组织切片（如切片厚度、变形、褶皱及包括染色质外观在内的

细胞形态)以及生物分子的质量和完整性的质量评估。生物分子的质量和完整性可通过使用对分析前步骤敏感的抗原的抗体或通过从切片中分离的生物分子的质量评估(如从切片中分离的RNA的完整性)来评估。

组织切片内的某些结构可作为原位检测试验的内部阳性和阴性对照。对于免疫组化检查,阳性对照组应与患者切片放置在相同的载玻片上。数字化原位检测图像(如使用玻片扫描仪生成)的分析比显微镜分析需要更严格的分析前质量标准。在对FFPE组织进行原位检测、将玻片数字化、并通过数字图像上的机器学习算法进行分析时,需要更严格的分析前质量标准。

比如,病理学专家可识别固定或切割导致的人工伪像,并在诊断时适当考虑这些因素。而机器学习算法产生的结果可能受到严重影响,从而导致错误的评估[49]。

附录 A

(资料性)

有关实验室开发的原位检测试验的验证和确认的建议

用于验证的案例应反映与临床检测案例相同的检验前过程。

关于验证实验室开发的原位检测试验的检验前程序的分析示例：

1. 将新试验结果与形态学和预期结果相关联；
2. 针对同一组织，将新试验结果与以前在同实验室用有效分析法所得的试验结果进行比较；
3. 针对相同组织集，将新试验结果与在另一实验室使用验证分析测试所得的试验结果进行比较；
4. 将新试验结果与先前确认的非免疫组化试验结果进行比较；
5. 如果存在正式能力测试程序所得的组织分级结果，则将新试验结果与其比较[43, 44]。

附录 B

(资料性)

组织处理的操作指南示例

注意：不同组织类型（如脑组织）和标本类型（如活检标本和手术标本）的组织处理持续时间和温度有所不同[45]。

1. 3.7%（质量比）标准缓冲福尔马林溶液环境温度处理2h
2. 3.7%（质量比）标准缓冲福尔马林溶液环境温度处理1h
3. 70%（体积比）乙醇环境温度处理1h
4. 95%（体积比）乙醇环境温度处理1h
5. 100%（体积比）乙醇环境温度处理45min
6. 100%（体积比）乙醇环境温度处理1h
7. 100%（体积比）乙醇环境温度处理1h
8. 清洗剂（二甲苯）环境温度第一次处理1h
9. 清洗剂（二甲苯）环境温度第二次处理1h
10. 蜡（石蜡）第一次58℃处理30min
11. 蜡（石蜡）第二次58℃处理1h
12. 蜡（石蜡）第三次58℃处理1.5h

参考目录

- ISO 20387, Biotechnology — Biobanking — General requirements for biobanking
- ISO/TS 20658, Medical laboratories — Requirements for collection, transport, receipt, and handling of samples
- ISO/IEC 17020, Conformity assessment — Requirements for the operation of various types of bodies performing inspection
- ISO/IEC 17025, General requirements for the competence of testing and calibration laboratories
- [1] Nature. com. Post-translational modifications.
<https://www.nature.com/subjects/post-translational-modifications>.
- [2] ESPINA VEDMISTONKH, HEIBYM, PIEROBON M, SCIRO M, MERRITT B, ET AL. A portrait of tissue phosphoprotein stability in the clinical tissue procurement process. *Mol. Cell. Proteomics*. 2008, 7 pp. 1998–2018
- [3] STUMPTNER C, GOGG-KAMERER M, VIERTIER C, DENK H, ZATLOUKAL K. Immunofluorescence and Immunohistochemical Detection of Keratins. *Methods Enzymol*. 2016, 568 pp. 139–162
- [4] STUMPTNER C, PABST D, LOIBNER M, VIERTLER C, ZATLOUKAL K. The impact of crosslinking and non-crosslinking fixatives on antigen retrieval and immunohistochemistry. *New Biotechnol*. 2019, 25 pp. 69–83
- [5] YILDIZ-AKTAS IZ, DABBS DJ, BHARGAVA R. The effect of cold ischemic time on the immunohistochemical evaluation of estrogen receptor, progesterone receptor. and HER2 expression in invasive breast carcinoma. *Mod. Pathol*. 2012, 25 pp. 1098–1105
- [6] K HOURY T, SAIT S, HWANG H, CHANDRASEKHAR R, WILDING G, TAN D. ET AL. Delay to formalin fixation effect on breast biomarkers. *Mod. Pathol*. 2009, 22 pp. 1457–1467
- [7] GUNDISCH S, GRUNDNER-CULEMANN K, WOLFF C, SCHOTT C, REISCHAUER B, MACHATTI MET AL. Delayed times to tissue fixation result in unpredictable global phosphoproteome changes. *J. Proteome Res*. 2013, 12 pp. 4424–4434
- [8] NING XHXU CS, SONG YC, XIAO Y, HU YJ, LUPINETTI FM, ET AL. Hypothermia preserves function and signaling for mitochondrial biogenesis during subsequent ischemia. *Am. J. Physiol*. 1998, 274 pp. 786–793
- [9] KAP M., SIEUWERTS AM, KUBISTA M, OOMEN M, ARSHAD S, RIEGMAN P. The influence of tissue procurement procedures on RNA integrity, gene expression, and morphology in porcine and human liver tissue. *Biopreserv Biobank*. 2015, 13 pp. 200–206
- [10] HEWITT SMLEWIS FA, CAO Y, CONRAD RC, CRONIN M, DANENBERG KD, ET AL. Tissue handling and specimen preparation in surgical pathology: issues concerning the recovery of nucleic acids from formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. *Arch. Pathol. Lab. Med*. 2008, 132 pp. 1929–1935
- [11] HEYLEN L, THIENPONT B, NAESENS M, LAMBRECHTS D, SPRANGERS B. The Emerging Role of DNA Methylation in Kidney Transplantation: A Perspective. *Am. J. Transplant*. 2016, 16 pp. 1070–1078
- [12] MCINNES E, Artefacts in histopathology. *Comp. Clin. Pathol*. 2005, 13 pp. 100–108
- [13] XIE RCHUNG JY, YLAYA K, WILLIAMS RL, GUERRERO N, NAKATSUKA N, ET AL. Factors influencing the degradation of archival formalin-fixed paraffin-embedded tissue sections. *J Histochem Cytochem*. 2011, 59 pp. 356–365
- [14] DAPSON RW, Macromolecular changes caused by formalin fixation and antigen retrieval. *Biotech. Histochem*. 2007, 82 pp. 133–140

- [15] BOGEN SA, VANI K, SOMPURAM SR. Molecular mechanisms of antigen retrieval: antigen retrieval reverses steric interference caused by formalin-induced cross-links. *Biotech. Histochem.* 2009, 84 pp. 207–215
- [16] BOENISCH T. Effect of heat-induced antigen retrieval following inconsistent formalin fixation. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* 2005, 13 pp. 283–286
- [17] SHI S.R., SHI Y, TAYLOR CR. Antigen retrieval immunohistochemistry: review and future prospects in research and diagnosis over two decades. *J. Histochem. Cytochem.* 2011, 59 pp. 13–32
- [18] CONDELLI V, LETTINI G, PATITUCCI G, D'AURIA F, D'AMICO M, VITA GET AL. Validation of vacuum-based refrigerated system for biobanking tissue preservation: analysis of cellular morphology, protein stability, and RNA quality. *Biopreserv Biobank.* 2014, 12 pp. 35–45
- [19] FOX C.H., JOHNSON FB, WHITING J, ROLLER PP. Formaldehyde fixation. *J. Histochem. Cytochem.* 1985, 33 pp. 845–853
- [20] PIZZOLATO P. Formalin pigment (acid hematin) and related pigments. *Am. J. Med. Technol.* 1976, 42 pp. 436–440
- [21] ENGEL KB, MOORE HM. Effects of preanalytical variables on the detection of proteins by immunohistochemistry in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2011, 135 pp. 537–543
- [22] MASUDA N, OHNISHI T, KAWAMOTO S, MONDEN M, OKUBO K. Analysis of chemical modification of RNA from formalin-fixed samples and optimization of molecular biology applications for such samples. *Nucleic Acids Res.* 1999, 27 pp. 4436–4443
- [23] KASHOFER K, VIERTLER C, PICHLER M, ZATLOUKAL K. Quality control of RNA preservation and extraction from paraffin-embedded tissue: Implications for RT-PCR and microarray analysis. *PLoS ONE.* 2013, 8 p. e70714
- [24] BASS B, MOORE HA. A Review of Preanalytical Factors Affecting Molecular, Protein, and Morphological Analysis of Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded (FFPE) Tissue. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2014, 138 p. 1520
- [25] WERNER M, CHOTT A, FABIANO A, BATTIFLORA H. Effect of formalin tissue fixation and processing on immunohistochemistry. *Am. J. Surg. Pathol.* 2000, 24 pp. 1016–1019
- [26] TERRY M., Advances in Pathology Tissue Management Reduce Formalin Use, Improve Quality and Cut Costs. *DARK Daily Laboratory and Pathology News*, 2014
- [27] BUESA RJ, PESHKOV MV. How much formalin is enough to fix tissues? *Ann. Diagn. Pathol.* 2012, 16 pp. 202–209
- [28] WILLIAMS JH, MEPHAM BL, WRIGHT DH. Tissue preparation for immunocytochemistry. *J. Clin. Pathol.* 1997, 50 pp. 422–428
- [29] CHU WSLIANG Q, TANG Y, KING R, WONG K, GONG M, ET AL. Ultrasound-accelerated tissue fixation/processing achieves superior morphology and macromolecule integrity with storage stability. *J. Histochem. Cytochem.* 2006, 54 pp. 503–513
- [30] TURNER BM, MOISINI I, HICKS DG. Molecular Pathology and Pre-Analytic Variables: Impact on Clinical Practice From a Breast Pathology Perspective. *Current Pathology Reports.* 2018, 6 pp. 125–134
- [31] VON WASIELEWSKI R., MENGEL M., WIESE B., RUDIGER T., MULLER-HERMELINK HK, KREIPE H. Tissue array technology for testing interlaboratory and interobserver reproducibility of

immunohistochemical estrogen receptor analysis in a large multicenter trial. *Am. J. Clin. Pathol.* 2002, 118 pp. 675–682

[32] REINEKE T, JENNI BABDOU MT, FRIGERIO S, ZUBLER P, MOCH H, ET AL. Ultrasonic decalcification offers new perspectives for rapid FISH, DNA, and RT-PCR analysis in bone marrow trephines. *Am. J. Surg. Pathol.* 2006, 30 pp. 892–896

[33] SCHRIJVER WAVAN DER GROEP P, HOEFNAGEL LD, TER HOEVE ND, PEETERS T, MOELANS CB, ET AL. Influence of decalcification procedures on immunohistochemistry and molecular pathology in breast cancer. *Mod. Pathol.* 2016, 29 pp. 1460–1470

[34] STERCHI DL, *Tissue Processing*, pp 317–352, in Bancroft, John D, Christopher Layton, and S K. Suvarna. *Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques*, 2013

[35] ABUJA PMA et al, in preparation)

[36] SPENCER LT, ET AL. *Tissue Processing*. In: BANCROFT JD, LAYTON C, SUVARNA SK. *Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques*, Seventh Edition, 2015, pp. 105–15

[37] THOMPSON SM, CRAVEN RA, NIRMALAN NJ, HARNDEN P, SELBY PJ, BANKS RE. Impact of pre-analytical factors on the proteomic analysis of formalin-fixed paraffin-embedded tissue. *Proteomics Clin. Appl.* 2013, 7 pp. 241–251

[38] MALMSTROM PU, WESTER K, VASKO J, BUSCH C. Expression of proliferative cell nuclear antigen (PCNA) in urinary bladder carcinoma: evaluation of antigen retrieval methods. *APMIS.* 1992, 100 pp. 988–992

[39] KRAFFT AE, DUNCAN BW, BIJWAARD KE, TAUBENBERGER JK, LICHY JH. Optimization of the Isolation and Amplification of RNA From Formalin-fixed, Paraffin-embedded Tissue: The Armed Forces Institute of Pathology Experience and Literature Review. *Mol. Diagn.* 1997, 2 pp. 217–230

[40] VON AHLFEN S., MISSEL A., BENDRAT K., SCHLUMBERGER M., Determinants of RNA Quality from FFPE Samples. *PLoS ONE.* 2007, 2 p. e126

[41] SPENCER LT, BANCROFT JD. *Microtomy: Paraffin and Frozen*. In BANCROFT JD, LAYTON C, SUVARNA SK. *Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques*. 7th ed. 2015, pp. 125–138

[42] SANDERSON T., ZARDIN G., *Immunohistochemistry Quality Control*. In: BANCROFT JD, LAYTON C, SUVARNA SK. *Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques*, Seventh Edition, 2015, pp. 435–54

[43] FITZGIBBONS PL, MURPHY DA, HAMMOND ME, ALLRED DC, VALENSTEIN PN. Recommendations for validating estrogen and progesterone receptor immunohistochemistry assays. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2010, 134 pp. 930–935

[44] FITZGIBBONS PTBRADLEY LA, FATHEREE LA, ALSABEH R, FULTON RS, GOLDSMITH JD, ET AL. Principles of Analytic Validation of Immunohistochemical Assays: Guideline from the College of American Pathologists and Laboratory Quality Center. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2014, 138 pp. 1432–1443

[45] CARSON F., CAPELLANO C.H., *Histotechnology: A Self-Instructional Text*. Fourth Edition, 2015, pp. 38

[46] GROELZ D., VIERTLER C., PABST D., DETTMANN N., ZATLOUKAL K., Impact of storage conditions on the quality of nucleic acids in paraffin embedded tissues. *PLoS ONE.* 2018, 13 p. e0203608

- [47] LOTT R, TUNNICLIFFE J, SHEPPARD E, SANTIAGO J, HLADIK C, NASIM M, ET AL. Practical Guide to Specimen Handling in Surgical Pathology. Version 8.0, revised: Sep 2018; College of American Pathologists (CAP) and National Society for Histotechnology (NSH)
- [48] COMPTON CCROBB JA, ANDERSON MW, BERRY AB, BIRDSONG GG, BLOOM KJ, CROTHERS JW, ET AL. Preanalytics and Precision Pathology Practices to Ensure Molecular Integrity of Cancer Patient Biospecimens for Precision Medicine. Arch Pathol Lab Med. 2019, 11 pp. 1346–1363
- [49] BUI MMRIEN MW, ALLISON KH, CHLIPALA E, COLASACCO C, KAHN AG, ET AL. Quantitative Image Analysis of Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Immunohistochemistry for Breast Cancer: Guideline From the College of American Pathologists. Arch. Pathol. Lab. Med. 2019, 10 pp. 1180–1195