

# Duální imunohistochemické barvení pomocí BenchMark ULTRA *na pracovišti MDgK-plus*

**Duální barvení v imunohistochemii bylo používáno při manuálním zpracování již v době, kdy barvicí automaty byly teprve ve smělých snech vědců.**

Vzhledem k pracovní a časové náročnosti a ne zcela ideálním výsledkům se tato metoda v minulosti v rutinní praxi neujala. Jiný pohled na tuto problematiku nám přinesla možnost vyzkoušet duální barvení na přístroji BenchMark ULTRA (dále jen BMK Ultra) od společnosti Ventana Medical Systems, Inc. (člen skupiny Roche Group), který je u nás v laboratoři nainstalován od května 2016.

Imunohistochemické barvení (dále jen IHC) se v dnešní době hojně využívá v patologii, ať už k rutinní nebo pokročilé diagnostice. Nejčastěji se používá jedna specifická protilátka k průkazu jednoho specifického antigenu v jednom histologickém řezu. BMK Ultra umožňuje průkaz i dvou specifických antigenů pomocí dvou specifických protilátek a dvou detekčních systémů v jednom histologickém řezu, což přináší několik výhod. Tou nejzásadnější je snížení nákladů na použitá skla a veškeré provozní roztoky potřebné k provedení barvicího cyklu. Dále tato metodika přináší časovou úsporu jak při zpracování v laboratoři, tak při stanovení diagnózy – lékaři nemusí prohlížet 2 preparáty, vidí dvojí výsledek v jednom řezu. Nezanedbatelná je i úspora pracovních pozic v přístroji (BMK Ultra disponuje celkem 30 pracovními pozicemi). Konkré-

ně při provozu v naší laboratoři to znamená úsporu 3–4 pracovních pozic denně, které je možné použít k dalšímu barvení, a tím zvýšit efektivitu práce. Neméně důležitá a mnohdy i zásadní je úspora bioptovaného materiálu, zejména u jehlových biopsií.

Na podzim roku 2016 jsme se zúčastnili Pracovního dne Roche Tissue Diagnostics v Kurdějově. V celkově velice zajímavém programu a spektru přednášek jsme jako jednu z nejzajímavějších hodnotili právě práci věnovanou duálnímu barvení a rozhodli jsme se tuto metodu hned vyzkoušet. Pro pilotní testování jsme zvolili duální barvení Ki-67/p16. Vybrali jsme vhodný materiál a ve spolupráci s Peterem Šurinou z varšavského Regionálního centra zákaznické podpory Roche sestavili potřebný protokol.

Výsledek byl víc než uspokojivý, což nás vedlo k vyzkoušení dalších kombinací protilátek.

Pro dosažení kvalitních výsledků vyžaduje duální barvení v přístroji BMK Ultra několik důležitých specifických kroků ve srovnání s klasickým IHC barvením. Stejně jako při běžném IHC se i u duálního IHC vyšetření používají speciální mikroskopická podložní skla s adhezivním povrchem s pozitivním elektrostatickým nábo-



jem. Nejlépe se nám osvědčila skla TOMO, dodávaná společností Roche, která jsou s přístrojem maximálně kompatibilní. Dále přístroj vyžaduje vytvoření specifického pracovního protokolu pro duální barvení. Schéma procedury pro tento protokol je

připraveno v SW přístroje a obsahuje všechny potřebné kroky. Stačí tedy jen vybrat hodnoty odpovídající zvolené dvojici protilátek.

Informace s odkazem na příslušný protokol je převedena do čárového kódu, který je pak vytištěn na štítek. Čárový kód následně definuje celý proces barvicího cyklu a stroj z něj čerpá veškeré informace týkající se průběhu barvení. Po vložení skel do stroje, příslušných reagentů na karusel a zásobních lahví může být spuštěn barvicí cyklus. Automat zajistí veškeré kroky pro zpracování vzorku včetně deparafinace řezů bez použití organických rozpouštědel – pracuje s využitím detergentů a pufrů, vysoké teploty a vířivého míchání přesně směřovaným proudem vzduchu, které zabraňuje zpětnému usazování rozpuštěného parafinu na skla. Z jednotlivých kítů přístroj automaticky aplikuje v příslušných časech jednotlivé reagenty včetně primární protilátky (primárních protilátek) a detekčního systému (detekčních systémů). Jednou z výhod BMK Ultra je i volitelná možnost manuální aplikace primární protilátky, je-li to situací vyžadováno. Posledním krokem automatického barvicího cyklu je aplikace hematoxylinu a modřidla (roztok  $\text{LiCO}_3$ ) pro kontrastní dobarvení jader. Po ukončení barvicího cyklu obsluha skla ze stroje vyjme a důkladně promyje v teplém detergentu (např. Jar). V případě standardního IHC s hnědou detekcí (tzv. hnědou koncovkou) je ručně provedeno odvodnění ve třech lázních alkoholu a projasnění ve třech lázních xylenu. Jelikož dlouhodobý pobyt v těchto vysokoprocenních organických rozpouštědlech by mohl ovlivnit kvalitu reakce, jsou koše se skly posouvány po dvouminutových intervalech. Posledním úkonem je zalepení (zamontování) skel ve fóliovém lepicím automatu a předání lékařům ke stanovení diagnózy.

Duální barvení se v porovnání se standardním IHC v několika krocích liší, zejména na počátku a na konci cyklu. Po několika případech, kdy se během cyklu duálního barvení sklíčko vysunulo z pracovní pozice, jsme na základě empirie začali před umístěním skla do stroje aplikovat malé množství ULTRA LCS (oleje, který je normálně užíván při barvicím procesu) na vyhřívanou podložku sklíčka (pracovní pozici).

Tímto krokem předcházíme tomu, aby bylo sklo při oplachování proudem pufru posunuto mimo pracovní pozici, čímž by bylo znemožněno zpracovat samotné barvení, protože barvicí cyklus je v takovém případě přerušen/ukončen. Vysychání podložky a následný možný posun skla mimo vyhrazené místo jsou způsobeny právě délkou cyklu charakteristickou pro duální barvení, která je delší než standardní IHC barvení s použitím jedné primární protilátky, a současně více pracovními kroky během barvení. Delší doba a složitější a četnější kroky jsou nutné pro vizualizaci dvou antigenů namísto jednoho, jako je tomu při standardním IHC.

Cyklus duálního barvení probíhá ve dvou fázích. V naší laboratoři používáme k vizualizaci duálního barvení následující dva detekční systémy. Pro standardní hnědý signál, hnědou koncovku, používáme kit obsahující DAB (3,3-diaminobenzidin), který je běžně využíván i pro standardní IHC vyšetření. Výstupem je hnědý nerozpustný komplex, hnědý signál. Pro druhou, červenou koncovku používáme kit s alkalickou fosfatázou (AP Red). Výsledkem je červené zbarvení. Oba kity jsou dodávány firmou Ventana Roche.

Nejzásadnějším rozdílem duálního barvení oproti standardnímu IHC barvení je závěrečná fáze procesu. Po skončení automatického zpracování, stejně jako u standardního IHC, je třeba zpracovaná skla odmastit, jelikož celý proces barvení probíhá pod vrstvou oleje (Ultra LCS). Skla se proto rovněž důkladně opláchnou v teplém detergentu. Poté však nenásleduje odvodnění v alkoholu a projasnění v xylenu, jak je tomu u standardního IHC používajícího pouze detekční systém s DAB. Důvodem je to, že tato rozpouštědla by kompletně smyla červenou barvu. Skla se proto po oplachu (odmaštění) umístí na 15 minut do termostatu ( $56^\circ\text{C}$ ), kde zcela vyschnou, a poté se po krátkém zvlhčení v xylenu rovnou vkládají do lepicího automatu.

Konkrétní duální barvení používaná na pracovišti MDgK-plus:

- Ki-67/p16
- Ki-67/HMB-45
- Ki-67/MELAN-A
- CD3/CD20
- Cyklin D1/CD23

- CK5,6/p63
- CD4/CD8

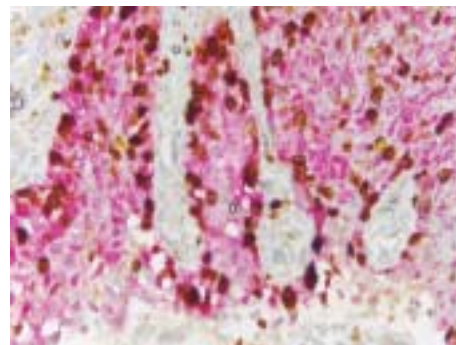
## Duální barvení Ki-67/p16

### Ki-67

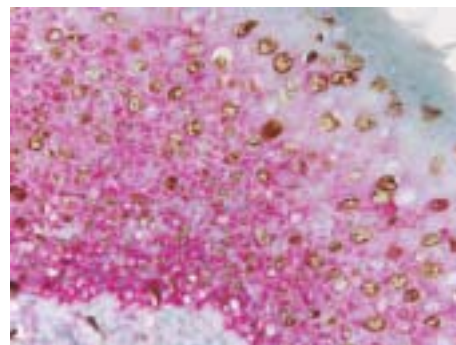
Jaderný protein exprimovaný ve všech aktivních fázích buněčného cyklu (tj. vyjma fáze G0). Indikuje růst a dělení buňky. Je používán jako nejdůležitější marker proliferativní aktivity, zejména nádorů.

### P16

Imunohistochemické vyšetření proteinu p16 v tkáňových řezech fixovaných ve formalínu a zalitých v parafínu (tzv. FFPE preparáty), získaných z cervikálních biopsií, slouží ke zvýšení diagnostické přesnosti v odlišení low-grade a high-grade cervikálních intraepiteliálních lézí (Obr. 1 a Obr. 2).



Obr. 1: Čípek děložní s high grade intraepiteliální lézí



Obr. 2: Elize vulvy s high grade VIN

## Duální barvení Ki-67/HMB-45

### HMB-45

Tato protilátka je užitečná při identifikaci melanocytů s tvorbou nezralých melanosomů v normální kůži, nervu a tkáni melanomu. Pozitivní výsledky napomáhají klasifikaci melanomů a melanocytických lézí a také napomáhají při rozlišování metastatických nemelanocytických melanomů od jiných špatně diferencovaných nádorů nejasného původu (Obr. 3).



## Duální barvení Ki-67/Melan-A

### Melan-A

Transmembránový protein nejisté funkce. Označuje melanocyty a je používán v diagnostice maligního melanomu. Pozitivita může být prokazována i v karcinomech dřevě nadledvin a angiomyolipomech. V panelu protilátek dif. dg. nádorů ovarii a varlat (Obr. 4).

## Duální barvení CD3/CD20

### CD3

Monoklonální myší protilátka proti lidskému antigenu CD3 představuje užitečný nástroj pro identifikaci T-buněk a s nimi souvisejících nádorů. Výsledky z panelu protilátek napomáhají v diferenciální identifikaci.

### CD20

CD20 (pan. B) je transmembránový protein exprimovaný na prekurzorech i zralých buňkách B-lymfocytární linie, ztrácí se při plazmocytární diferenciaci buněk. Je používán k diagnostice B-lymfocytární řady a nádorů z ní odvozených (Obr. 5).

## Duální barvení cyklin D1/CD23

### Cyklin D1

Protilátka proti cyklinu D1 je užitečná při identifikaci lymfomů z plášťových buněk.

### CD23

Protilátka na CD23 je užitečná při identifikaci normálních B-lymfocytů i maligních lymfomů. Společně s panelem dalších protilátek je anti-CD 23 zejména užitečná při rozlišování mezi chronickou lymfatickou leukémií z B-buněk; lymfomem z malých lymfocytů a lymfomem z plášťových buněk (Obr. 6).

## Duální barvení CK5,6/p63

### CK5,6

Cytokeratiny jsou fibrózní polypeptidy. Jsou důležitou součástí cytoskeletu ve většině epiteliálních buněk. CK5 je přítomný v bazální, střední a povrchové vrstvě stratifikovaných epitelů, stejně jako v přechodných epitelech, složených epitelech a v mezoteliálních buňkách a mezoteliomu. CK6 je přítomný v proliferačním skvamózním epitelu. Protilátky proti CK5,6 byly shledány cennými pro rozlišení mezi níže diferencovanými skvamózními karcinomy a adenokarcinomy. Anti CK5,6 byla také

shledána užitečnou v diferenciální diagnostice atypických proliferací prsu.

### P63

Protilátky na protein p63, regulátor proliferace bazálních buněk, mohou být užitečné při identifikaci adenokarcinomu prostaty, při diferenciaci mezi karcinomem prsu in situ a karcinomem prsu, při odlišení karcinomu skvamózních buněk od adenokarcinomu plic a odlišení skvamózního cervikálního karcinomu dělohy od adenokarcinomu děložního hrdla (Obr. 7).

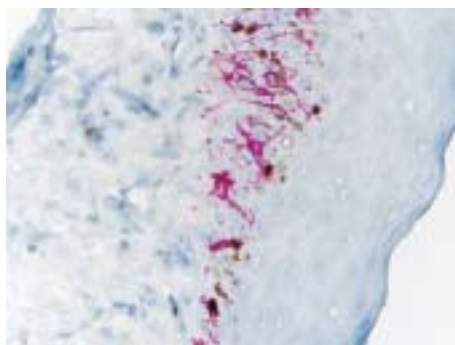
## Duální barvení CD4/CD8

### CD4

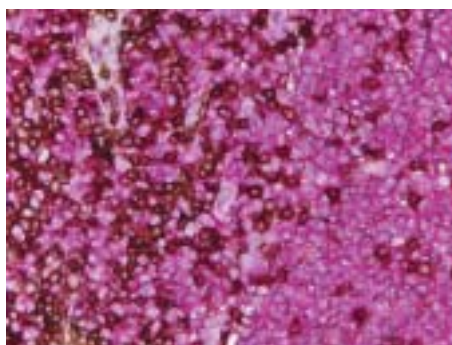
Protilátka značí thymocyty a T-helper buňky. Protilátka je užitečná při identifikaci T-buněčných lymfomů, zejména mycosis fungoides a nespecifikovaných periferních T-buněčných lymfomů.

### CD8

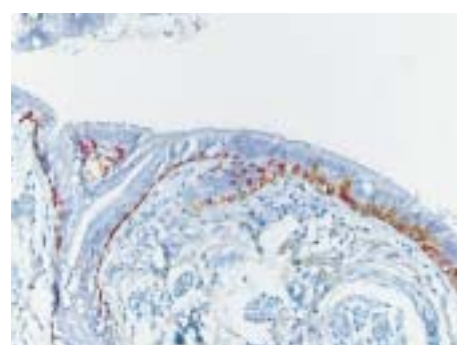
Protilátkami značené cytotoxické/supresorové T-buňky jsou užitečným indikátorem pro identifikaci zdravých buněk a jejich patologických linií, dále slouží k rozlišení mezi mycosis fungoides a kožními zánětlivými procesy (Obr. 8).



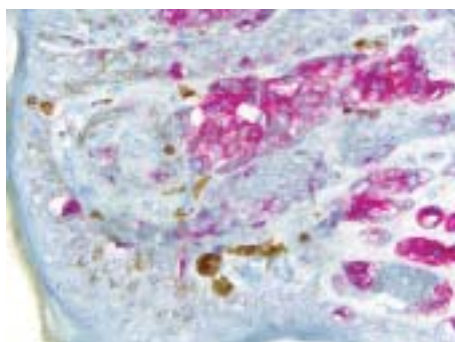
Obr. 3: Kůže – kožní melanom



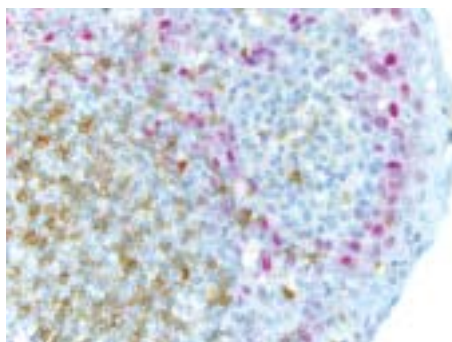
Obr. 5: Lymfatická uzlina – folikulární lymfom



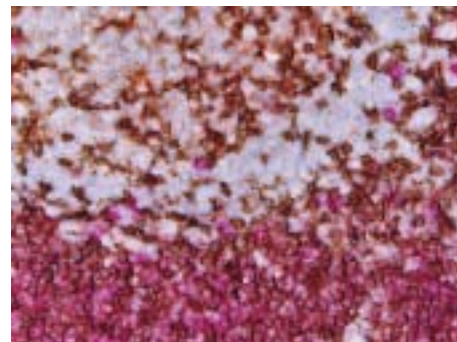
Obr. 7: Plicní tkáň – spinoCa plic



Obr. 4: Kůže – melanocytární naevus smíšeného typu



Obr. 6: Tonzila – tonzilitis chronica



Obr. 8: Tonzila – amygdalitis lacunaris chronica s masami keratohyalinu