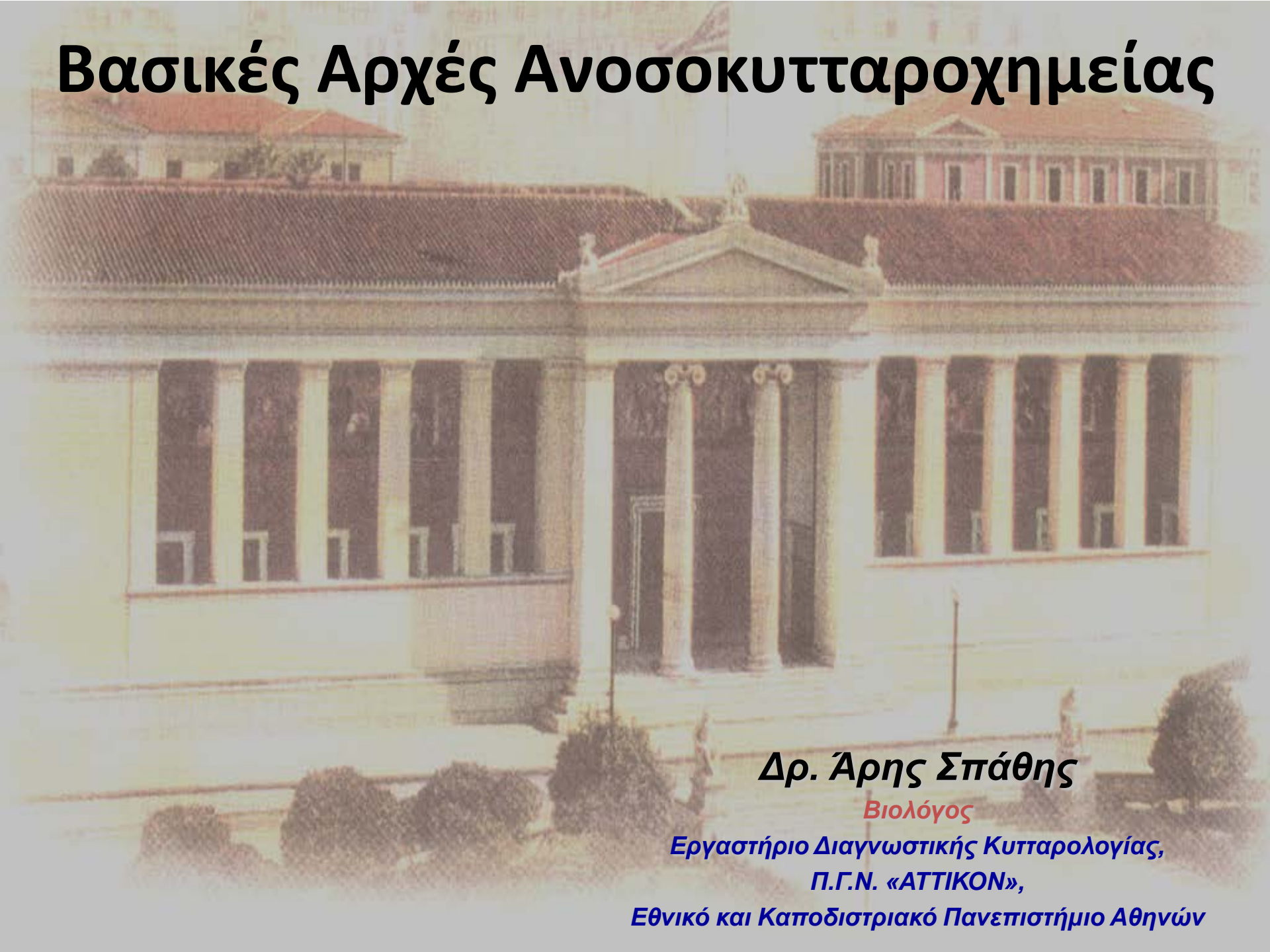
Βασικές Αρχές Ανοσοκυτταροχημείας



Δρ. Άρης Σπάθης

Βιολόγος

Εργαστήριο Διαγνωστικής Κυτταρολογίας,

Π.Γ.Ν. «ΑΤΤΙΚΟΝ»,

Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Ανοσοϊστοχημεία (ICH)
Ανοσοκυτταροχημεία (ICC)

- Ανίχνευση μιας (συνήθως) πρωτεΐνης
- Ημι-ποσοτική (υπό όρους)
- Πρώτη αναφορά το 1941 (Coons, ανοσοφθορισμός, τομές κρυοστάτη)
- Σύζευξη αντισωμάτων με ένζυμα (Abrameas)
- Από το 1974 δείχθηκε πως μπορεί να εφαρμοστεί σε ιστούς εγκλεισμένους σε παραφίνη (Taylor)
- Μετά το 1990 εντάχθηκε σε κλινική εφαρμογή

1. Coon A.H., “Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group, Proc Soc Exp Biol., 1941;47:200
2. Taylor C.R., “The demonstraion of plasma cells nd other immunoglobulin containing cells in formalin-fixed paraffin-embedded tissues using peroxidase labeled antibody, J. Clin. Pathology, 1974;27:14
3. Abrameas S, “Enzyme markers: Their linkage with proteins and use in immunohistochemistry”, Histochem., 1972;4:321
4. Dabbs D.J., “Diagnostic Immunohistochemistry” 3rd Ed., Elsevier 2010

Εφαρμογές

- Επικουρική μέθοδος: «Σκοπός όλων των χρώσεων αποτελεί η μικροχημική αναγνώριση της ύπαρξης και κατανομής ουσιών που έχουν γίνει μορφολογικά αντιληπτές» [1]
  - Διάγνωση
  - Κατηγοριοποίηση
  - Σταδιοποίηση
  - Απόφαση λήψης θεραπείας (ER, PR)
  - Συσχέτιση με γονιδιακές αλλαγές (HER2, MSI, p53)

1. Mann J., “Physiologic histology”, Oxford University Press, Coon A.H., “Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group, Proc Soc Exp Biolo, 1941;47:200
2. Dabbs D.J., “Diagnostic Immunohistochemistry” 3rd Ed., Elsevier 2010

Αντίσωμα

- Τετραμερής πολυπεπτιδική αλυσίδα (ανοσοσφαιρίνη):
  - 2 βαριές (450-550 αμινοξέα)
  - 2 ελαφριές (211-230 αμινοξέα)
- Τάξη αντισώματος καθορίζεται από τις IgH αλύσους (Ισότυπος)
- Ειδικότητα αντισώματος από το συνδυασμό των βαρέων με τις ελαφρές αλύσους (κ, λ)

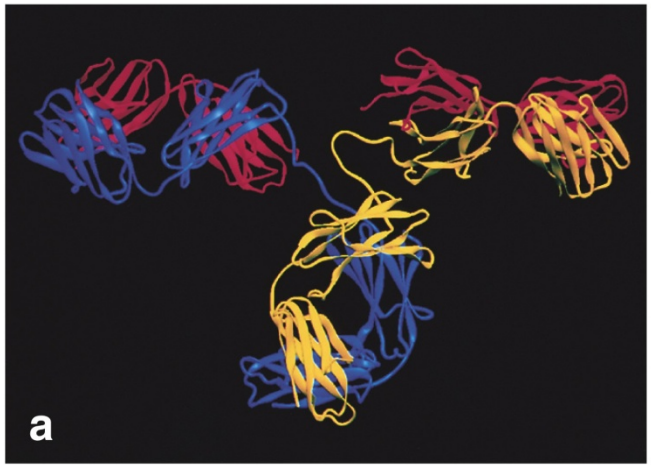


Figure 3-1 part 1 of 3 Immunobiology, 6/e. (© Garland Science 2005)

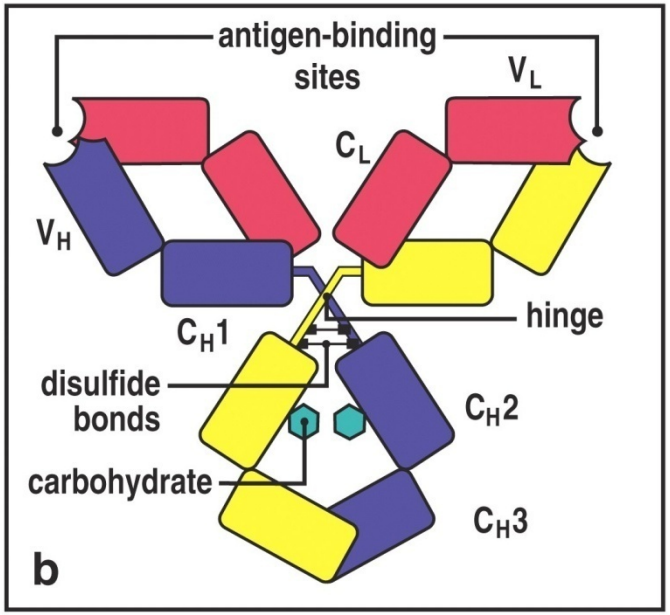
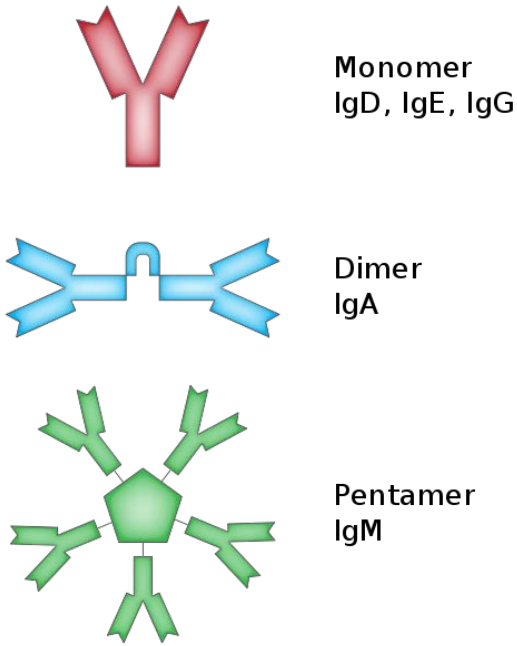


Figure 3-1 part 2 of 3 Immunobiology, 6/e. (© Garland Science 2005)

1. Janeway C., “Immunobiology”, 4th ed., Garland Science, 2011
2. Dabbs D.J., “Diagnostic Immunohistochemistry” 3rd Ed., Elsevier 2010

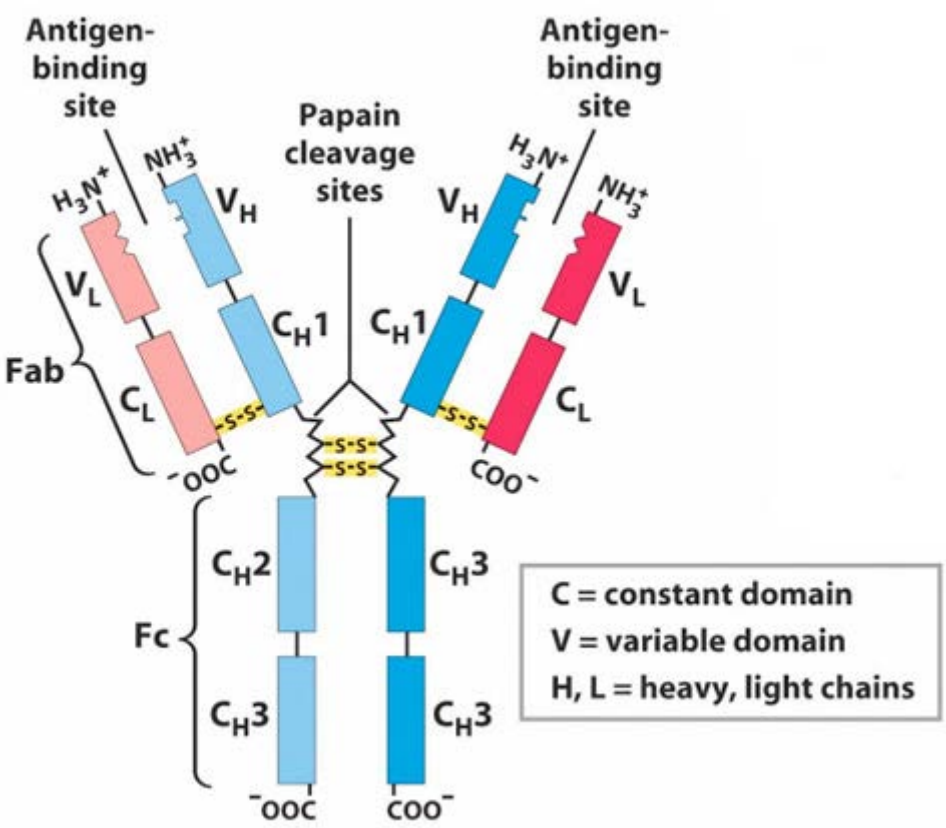
Ισότυποι αντισωμάτων

- Μονομερή
  - IgGs (1,2,3,4) (75% των ανοσοσφαιρινών, διαπερνούν πλακούντα, τόσο μεμβράνη Β λεμφοκυττάρων όσο και εκκρινόμενη)
  - IgD (<1%, κυρίως σαν αντιγονικός υποδοχέας των Β λεμφοκυττάρν)
  - IgE (Βρίσκεται κυρίως σε βασεόφιλα, μαστοκύτταρα, δρα εναντίον ελμινθικών παρασίτων, σχετίζεται με αλλεργίες)
- Διμερή
  - IgA (γάλα, δάκρυα, σάλιο, βλεννογόνοι)
- Πενταμερή
  - IgM (χυμική ανοσία ως εκκρινόμενο πενταμερές, μονομερές στην επιφάνεια των Β λεμφοκυττάρων)



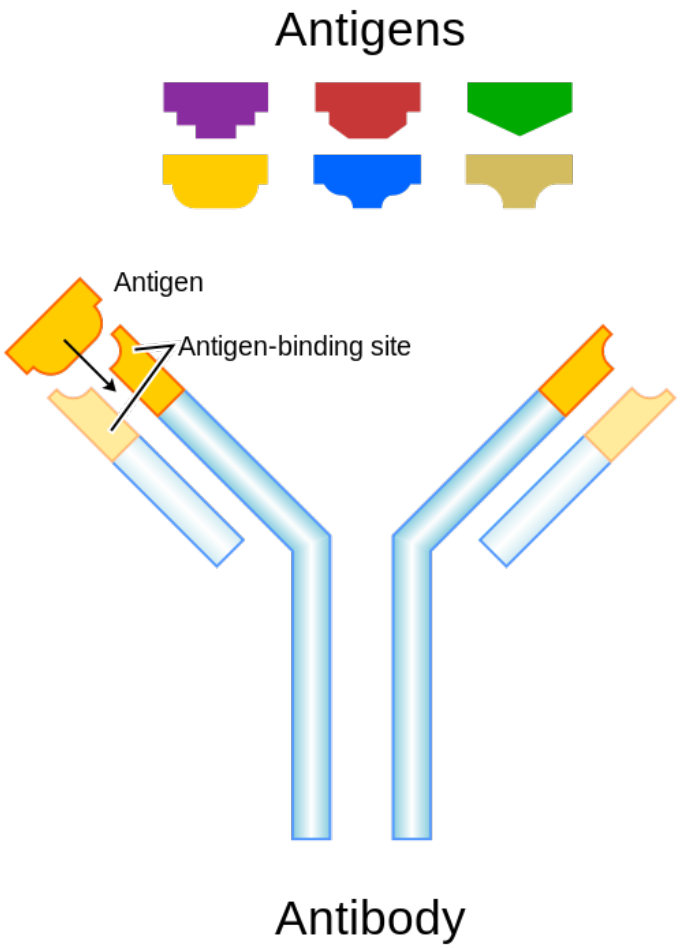
Περιοχές αντισωμάτων

- Fab:
  - Fragment antigen binding region (Fab) περιέχει τις μεταβλητές (V) περιοχές υπεύθυνες για την ειδικότητα και σταθερές περιοχές (C).
- Fc:
  - Fragment crystallizable region (Fc) περιέχει σταθερές περιοχές ειδοειδικές (άνθρωπος, ποντικός, κ.α.) υπεύθυνες για την αλληλεπίδραση με τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος.

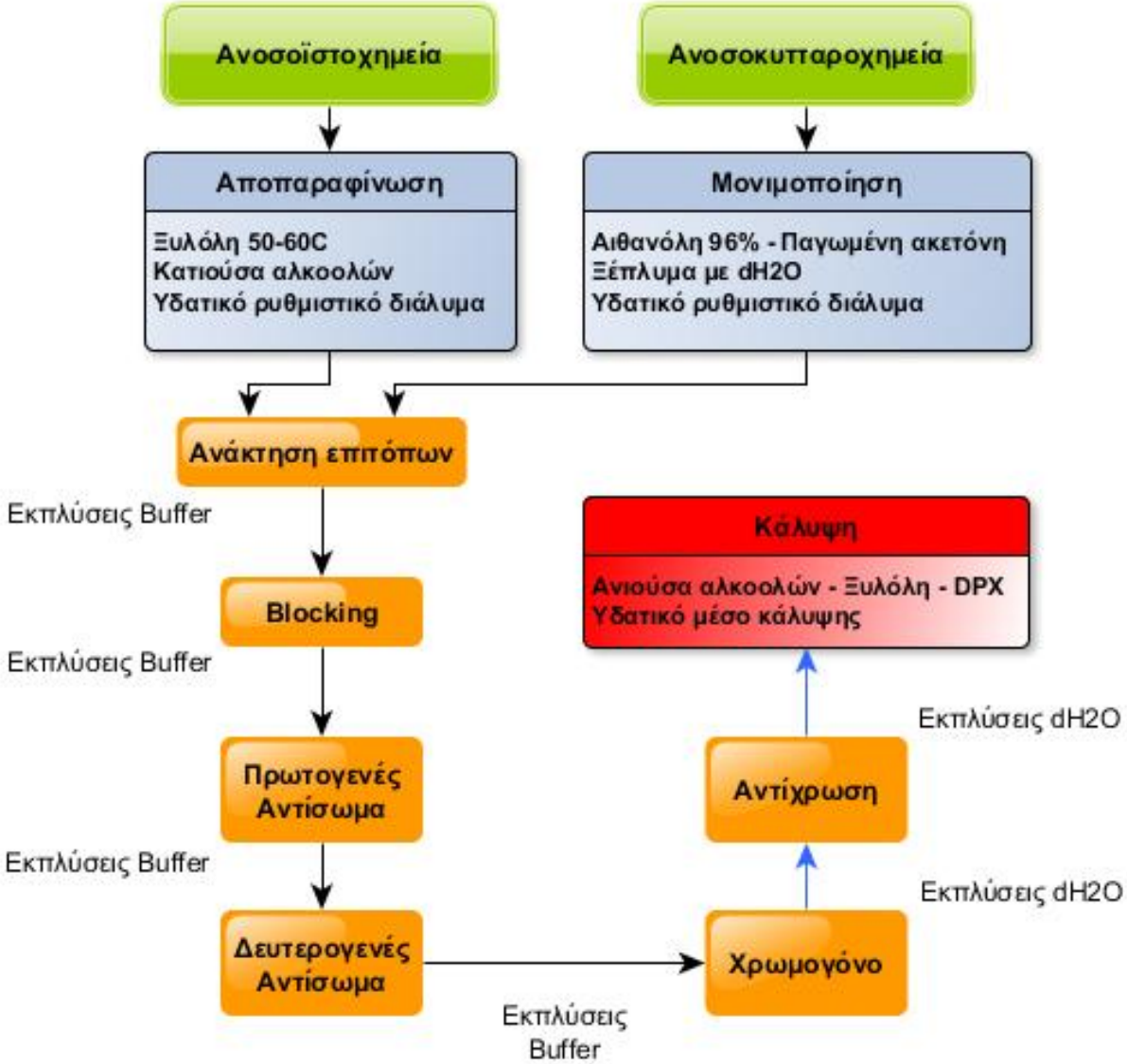


Αντιγόνο

- Αντιγόνο είναι οποιαδήποτε ένωση μπορεί να αναγνωριστεί ειδικά από τα Β ή Τ λεμφοκύτταρα.
- Προκαλεί παραγωγή αντισώματος από τα Β λεμφοκύτταρα.
- Το αντίσωμα είναι ειδικό έναντι <u>περιορισμένου</u> τμήματος του αντιγόνου 7-20 αμινοξέων (επίτοπος) .

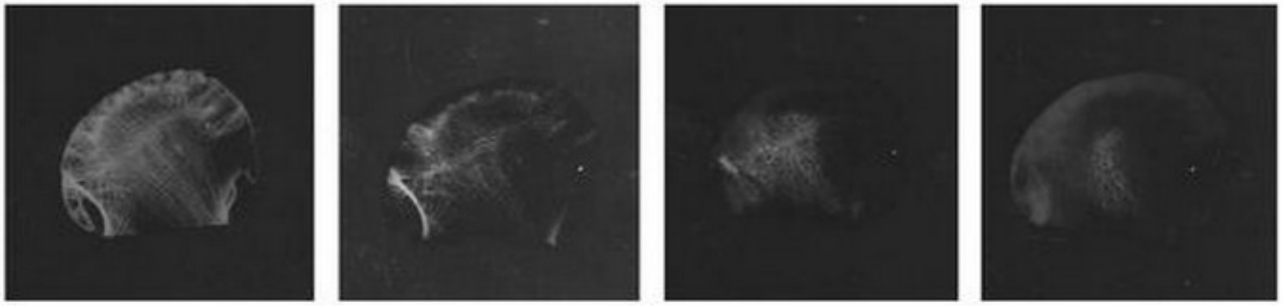


Συνοπτικά


Ανοσοϊστοχημεία
Ανοσοκυτταροχημεία
Αποπαραφίνωση
Ξυλόλη 50-60C
Κατιούσα αλκοολών
Υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα
Μονιμοποίηση
Αιθανόλη 96% - Παγωμένη ακετόνη
Ξέπλυμα με dH2O
Υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα
Ανάκτηση επιτόπων
Εκπλύσεις Buffer
Κάλυψη
Ανιούσα αλκοολών - Ξυλόλη - DPX
Υδατικό μέσο κάλυψης
Blocking
Εκπλύσεις Buffer
Εκπλύσεις dH2O
Πρωτογενές Αντίσωμα
Αντίχρωση
Εκπλύσεις Buffer
Εκπλύσεις dH2O
Δευτερογενές Αντίσωμα
Χρωμογόνο
Εκπλύσεις Buffer

Αφαλάτωση

- Απομάκρυνση των αλάτων από απασβεστωμένα υλικά ώστε να μπορεί να ληφθεί τομή.
- Χρησιμοποιούνται:
  1. Ισχυρά οξέα (Νιτρικό 5%, Υδροχλωρικό 5-10%, Χρωμικό, κ.α.)
  2. Ασθενή οξέα με άλατα (Φορμικό 10% με κιτρικό νάτριο, κ.α.)
  3. Χηλικές ενώσεις (Ουδέτερο διάλυμα EDTA με pH7)
- Αναγκαία η ορθή μονιμοποίηση του υλικού πριν την αφαλάτωση ώστε να μην καταστραφεί από τα οξέα.



0 hours 24 hours 96 hours 144 hours

1. Novocastra, “An introduction to decalsification”, Leica

Αρχικό υλικό

Υλικό	Μονιμοποίηση	Προπαρασκευή
Επιχρίσματα	Καμία (αέρας) Αιθανόλη	Παγωμένη ακετόνη Αιθανόλη B5 Φορμόλη
Liquid Based Cytology	Διάλυμα αιθανόλης (SurePath) Διάλυμα μεθανόλης (ThinPrep)	Παγωμένη ακετόνη Αιθανόλη Φορμόλη
Cell Block	Φορμόλη ή 70% αιθανόλη (Shandon) Διάλυμα μεθανόλης (ThinPrep, Cellient)	Αποπαραφίνωση - Κατιούσα
Ανοσοϊστοχημεία	Φορμόλη	Αποπαραφίνωση - Κατιούσα

Ενυδάτωση υλικού

- Όλα τα στάδια της ανοσοκυτταροχημείας πραγματοποιούνται με υδατικά διαλύματα.
- Επιχρίσματα που μονιμοποιούνται σε παράγοντες που προκαλούν αφυδάτωση (αλκοόλες, ακετόνη), χρειάζεται να ενυδατωθούν.
- Cell block που έχουν εγκλειστεί σε παραφίνη, χρειάζονται αποπαραφίνωση και ενυδάτωση.

Υγρά έκπλυσης

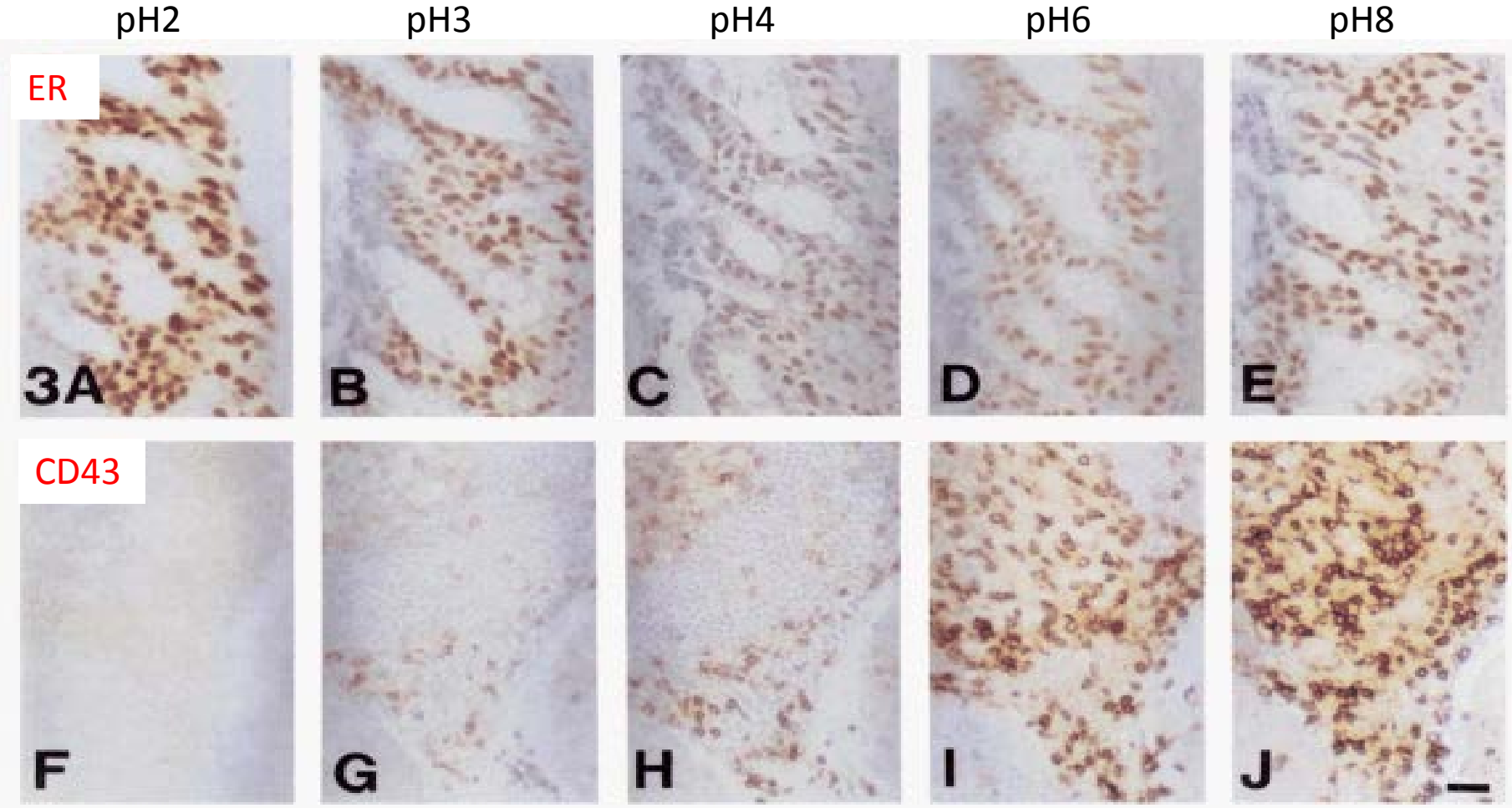
- Ισότονα ουδέτερα ρυθμιστικά διαλύματα:
  - Φωσφορικά (Phosphate Buffered Saline, PBS) που αποτελεί συνδυασμό των Na_2HPO_4 και KH_2PO_4.
  - Με βάση το Tris (20-100mM) (tris[hydroxymethyl]aminomethane) παρουσία HCl για τη διόρθωση του pH και NaCl (150mM) για να είναι ισότονο.
  - TBS θεωρείται πως μειώνει το υπόστρωμα. Όταν χρησιμοποιείται AP, καλύτερα TBS καθώς PBS δρα και ως υπόστρωμα της AP.
- Απορρυπαντικά
  - TWEEN 20 (Polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate) σε συγκέντρωση 0.05-0.5 v/v.
  - Triton-X ($C_{14}H_{22}O(C_2H_4O)n$) το οποίο υπάρχει σπάνια σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις για τη διαπερατοποίηση της μεμβράνης των κυττάρων.

Ανάκτηση επιτόπων

- Πολλοί επίτοποι είναι «κρυφοί»:
  1. Υδρόφοβα τμήματα πρωτεϊνών
  2. Αλλαγή στερεοδιάταξης λόγω μονιμοποιητικού
  3. Αντίσωμα έχει συντεθεί με βάση πεπτιδική αλληλουχία που δεν είναι προσβάσιμη σε Κ.Σ.
- Ανάκτηση επιτόπου (Heat Induced Epitope Retrieval, HIER)
  1. Ενζυματική πέψη δείγματος (πεψίνη, τρυψίνη, πρωτεϊνάση Κ)
  2. Επώαση σε διαλύματα ανάκτησης επιτόπων (Κιτρικό οξύ, Tris-EDTA, κ.α.)
  3. Εμπορικά διαλύματα ανάκτησης επιτόπων και αποπαραφίνωσης

1. Huang S.N., “Immunohistochemical demonstration of Hepatitis B core and surface antigens in paraffin sections”, Lab Inv., 1975;33:88
2. Shi S.R., “Antigen retrieval in formali-fixed, paraffin-embedded tissues: An enhanced method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections”, J Histoc. Czytochem., 1991;102:734

Ανάκτηση επιτόπων



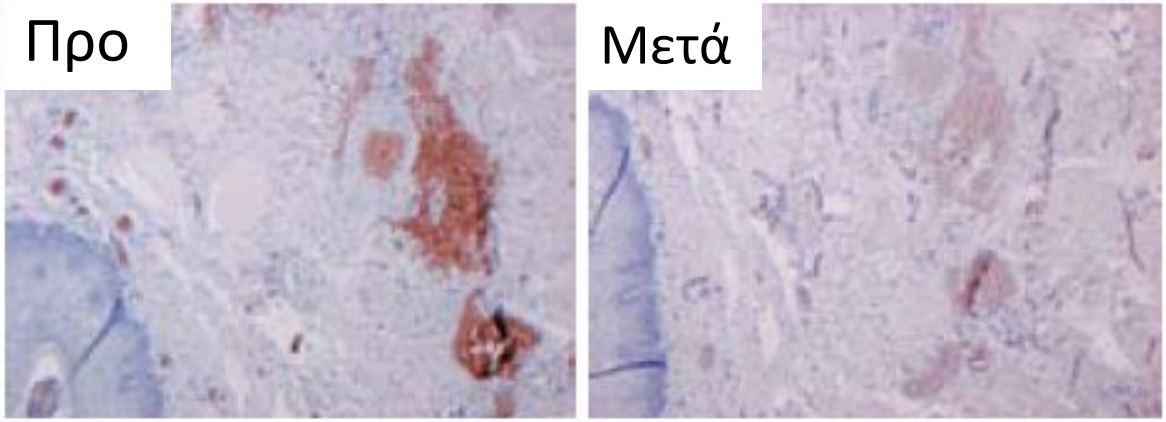
1. Shi S.R., “Antigen retrieval in formali-fixed, paraffin-embedded tissues: An enhanced method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections”, J Histoc. Czytochem., 1991;102:734

Αδρανοποίηση ενζύμων

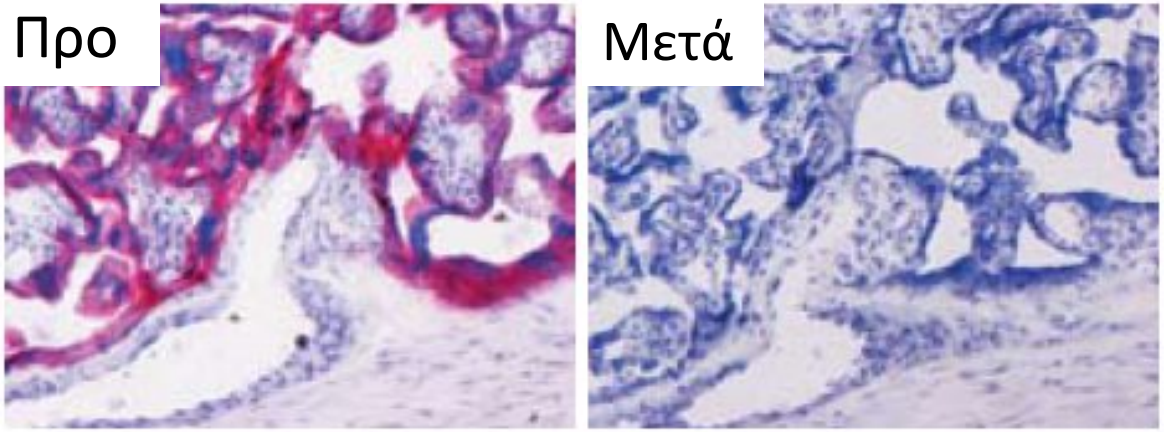
- Τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα συστήματα ανίχνευσης / 2γενή αντισώματα χρησιμοποιούν ένζυμα (υπεροξειδάση, αλκαλική φωσφατάση) για τη παραγωγή χρώματος.
- Τα ένζυμα αυτά υπάρχουν και στα υπο εξέταση κύτταρα (ερυθρά, ουδετερόφιλα, ηπατοκύτταρα, κ.α.)
- Αδρανοποίηση τους γίνεται πριν την προσθήκη του δευτερογενούς:
  - Μερική αδρανοποίηση πραγματοποιείται κατά τη μονιμοποίηση του υλικού (AP αδρανοποιείται πλήρως σε φορμόλη)
  - Επώαση υλικού με περίσσεια υποστρώματος του ενζύμου ώστε να εξασθενήσει τη δραστικότητα του (H_2O_2 – Μεθανόλη, Levamisole)

Αδρανοποίηση ενζύμων

- Ερυθρά με HRP δραστικότητα



- Κύτταρα πλακού-ντα με AP δραστικότητα



1. Dako, “immunohistochemical Staining Methods”, 5th ed, 2009, Dako

Δέσμευση μη-ειδικών θέσεων

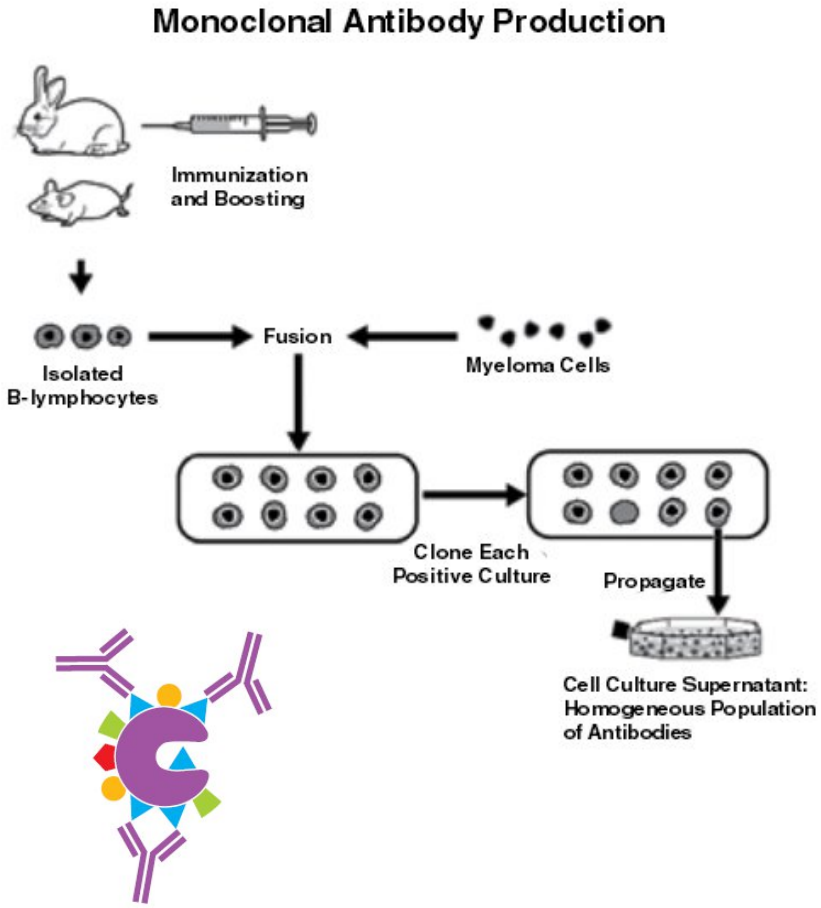
- Σκοπός είναι η μείωση μη ειδικής δέσμευσης του αντισώματος σε:
  - Δομές με φορτίο αντίθετο του αντισώματος (π.χ. κολλαγόνο).
  - Επιτόπους με μερική ομολογία με τον παράτοπο του αντισώματος (ειδικά για πολυκλωνικά αντισώματα που έχουν πολλαπλούς παρατόπους).
  - Κύτταρα που διαθέτουν υποδοχείς Fc (μονοκύτταρα, μακροφάγα, κ.α.)
- Χρησιμοποιείται συνήθως ορός από το είδος στο οποίο έχει φτιαχτεί το 2γενές αντίσωμα ή σύστημα ανίχνευσης.
- Επώαση 5-30min προ του πρωτογενούς.
- Συχνά δεν ακολουθεί έκπλυση.

Πρωτογενές αντίσωμα

- Το δείγμα επωάζεται με διάλυμα πρωτογενούς αντισώματος. Το διάλυμα περιέχει:
  - Κατάλληλη ποσότητα αντισώματος (τάξη μεγέθους 0.5-500μg)
  - Ρυθμιστικό διάλυμα (ισότονο, ουδέτερο)
  - Ήπιο απορρυπαντικό και πρωτεΐνες (μείωση μη-ειδικής δέσμευσης)
  - Αντιμικροβιακούς παράγοντες (Sodium azide, Proclin)
- Ο χρόνος επώασης είναι ανάλογος:
  - Του τίτλου του αντισώματος
  - Της θερμοκρασίας επώασης (4° C 12-18h, RT 15-60min)
- Υπάρχει η επιλογή προ-αραιωμένων αντισωμάτων από κατασκευαστές. Οι αραιώσεις έχουν προκύψει για <u>ανοσοϊστοχημεία</u>.

Μονοκλωνικά αντισώματα

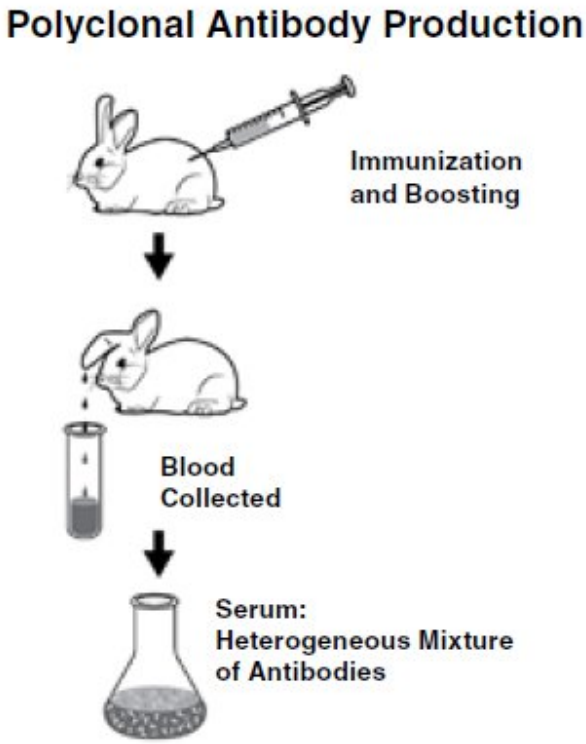
- Παράγονται με τη μέθοδο του υβριδιώματος
- Παλιότερα σε ποντικούς, πλέον και σε κουνέλια
- Ομοιογενής πληθυσμός ανοσοσφαιρινών εναντίον <u>ενός</u> επιτόπου
- Συνήθως υψηλό τίτλο και ειδικότητα

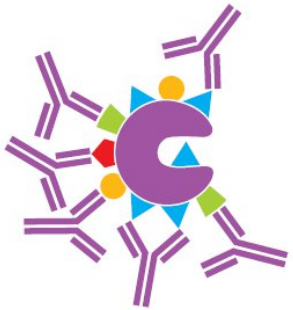


1. Kohler G, “Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined origin”, Nature, 1975;256:495
2. Dako, “immunohistochemical Staining Methods”, 5th ed, 2009, Dako

Πολυκλωνικά αντισώματα

- Παράγονται με ευαισθητοποίηση in-vivo θηλαστικών (κουνέλι, γαϊδούρι, κ.α.)
- Ετερογενής πληθυσμός ανοσο-σφαιρινών εναντίον <u>πολλαπλών</u> επιτόπων ενός αντιγόνου
- Συνήθως μικρότερο τίτλο και ειδικότητα
- Μικρότερος χρόνος παραγωγής





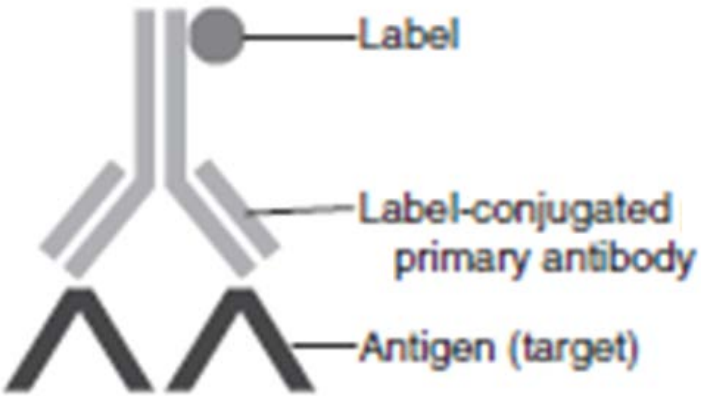
1. Dako, “immunohistochemical Staining Methods”, 5th ed, 2009, Dako

Ανίχνευση ενός σταδίου (Άμεση)

- Το πρωτογενές έχει δεσμευμένο:
  - Φθοριόχρωμα
  - Ένζυμο
  - Άλλη ουσία

+ Ταχεία μέθοδος, με λίγα βήματα, δυνατότητα για πολλαπλά αντισώματα

- Μειωμένη Ευαισθησία



1. Renshaw S, “Immunohistochemistry: Methods Express”, Scion Publishing Ltd, Bloxham, UK, 2010

Συστήματα ανίχνευσης (2γενή)

- Το δευτερογενές αντίσωμα έχει παράτοπο που αναγνωρίζει την Fc περιοχή του πρωτογενούς.
  - 1γενές παραγμένο σε ποντικό → 2γενές παραγμένο σε κουνέλι έναντι Fc περιοχής IgG ποντικού
  - Ένα δευτερογενές anti-mouse δεσμεύεται σε όλα τα 1γενή που έχουν παραχθεί σε mouse
  - Έχουν μικρή cross-reactivity: anti-mouse μπορεί να αναγνωρίζει 1γενή από mouse και rat αλλά κανονικά όχι rabbit
- Τα δευτερογενή μπορεί να έχουν δεσμευμένα:
  - Φθοριοχρώματα (Ανοσοφθορισμός, Κυτταρομετρία ροής)
  - Ένζυμα (Ανοσοϊστοχημεία, Ανοσοκυτταροχημεία, Western blot)
  - Άλλες ενώσεις (Βιοτίνη, Πρωτεϊνη Α)

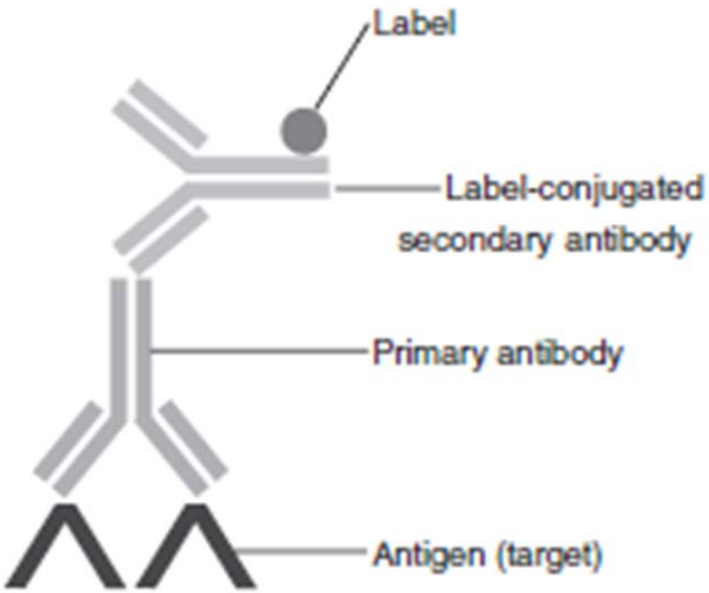
Δύο σταδίων (Έμμεση)

- Ένα δευτερογενές αντίσωμα για όλα τα πρωτογενή ενός είδους.

+ Μικρότερη ποσότητα από το πρωτογενές είναι αναγκαία.

+ Δυνατότητα διπλής χρώσης όταν τα πρωτογενή είναι από διαφορετικά είδη ή διαφορετικής υπόταξης.

- Αύξηση χρόνου, μέτρια ευαισθησία



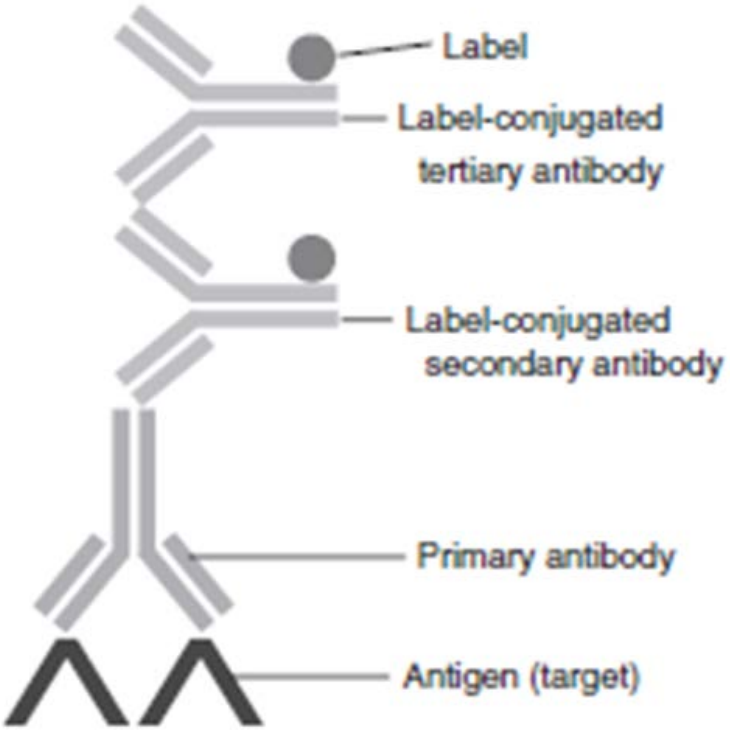
1. Renshaw S, “Immunohistochemistry: Methods Express”, Scion Publishing Ltd, Bloxham, UK, 2010

Τριών σταδίων (έμμεση)

- Παρόμοια με των 2 σταδίων.
- Περιέχει επιπλέον τρίτο αντίσωμα που αναγνωρίζει το 2γενές, αυξάνοντας τον αριθμό των σεσημασμένων μορίων.

+ Μεγαλύτερη ευαισθησία

- Αύξηση χρόνου, κόστους



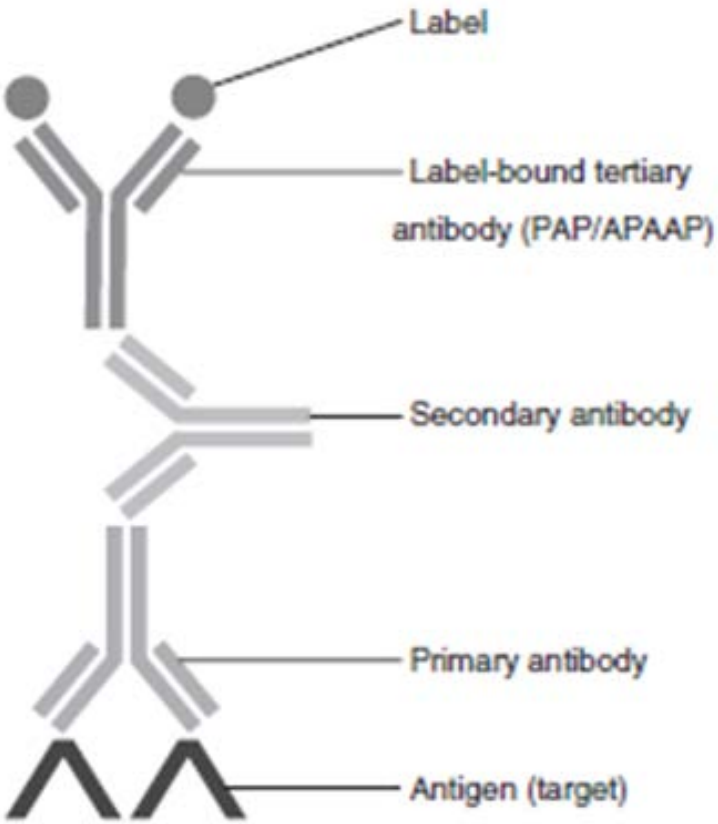
1. Renshaw S, “Immunohistochemistry: Methods Express”, Scion Publishing Ltd, Bloxham, UK, 2010

PAP/APAP (3 σταδίων, έμμεση)

- Peroxidase anti-peroxidase / alkaline phosphatase anti-alkaline phosphatase
- Πρωτογενές και τριτογενές έχουν παραχθεί στο ίδιο είδος. Δευτερογενές έναντι αυτού του είδους.

\+ Μεγαλύτερη ευαισθησία

\- Αύξηση κόστους



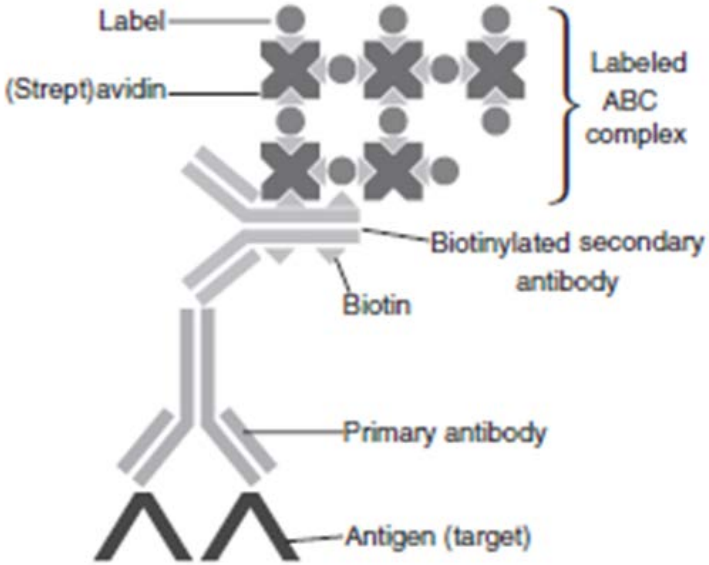
1. Renshaw S, “Immunohistochemistry: Methods Express”, Scion Publishing Ltd, Bloxham, UK, 2010

ABC (2 σταδίων, έμμεση)

- Δευτερογενές σεσημασμένο με βιοτίνη (B7).
- Προστίθεται αβιδίνης (φυσικό πρόσδεμα της βιοτίνης) και σύμπλεγμα βιοτίνης - μορίου ανίχνευσης.

+ Πολύ αυξημένη ευαισθησία

- Περίπλοκη, χρονοβόρα
- Ενδογενής βιοτίνη σε ιστούς όπως νεφρός, ήπαρ, σιτευτικά κύτταρα κ.α.



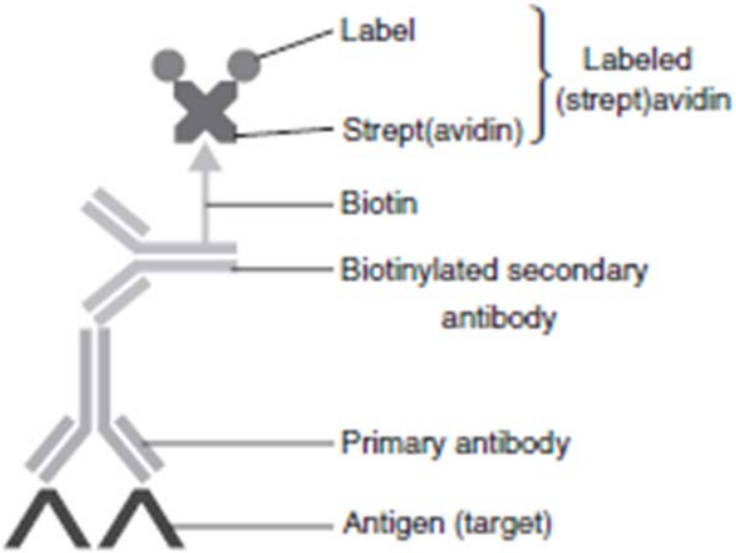
1. Renshaw S, “Immunohistochemistry: Methods Express”, Scion Publishing Ltd, Bloxham, UK, 2010

LA / LSA (2 σταδίων, έμμεση)

- Δευτερογενές σεσημασμένο με βιοτίνη (B7).
- Προστίθεται αβιδίνη ή στρεπταβιδίνη σημασμένη με μόριο ανίχνευσης.

+ 8–10 φορές πιο ευαίσθητη, λόγω μικρότεορυ μεγέθους του συμπλέγματος

- Περίπλοκη, χρονοβόρα
- Ενδογενής βιοτίνη σε ιστούς όπως νεφρός, ήπαρ, σιτευτικά κύτταρα κ.α.

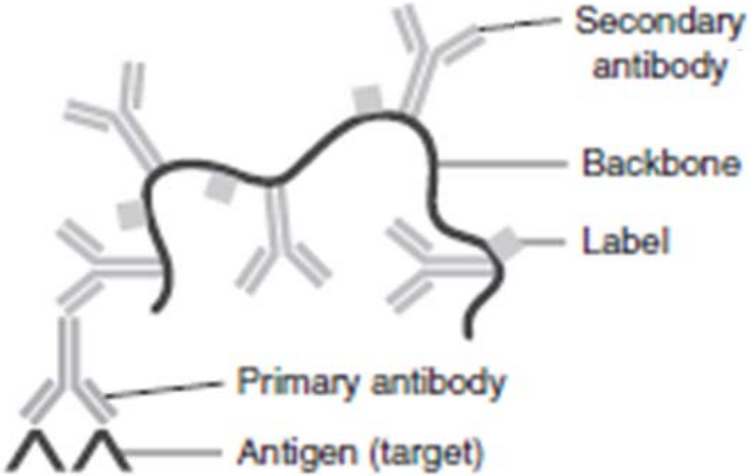


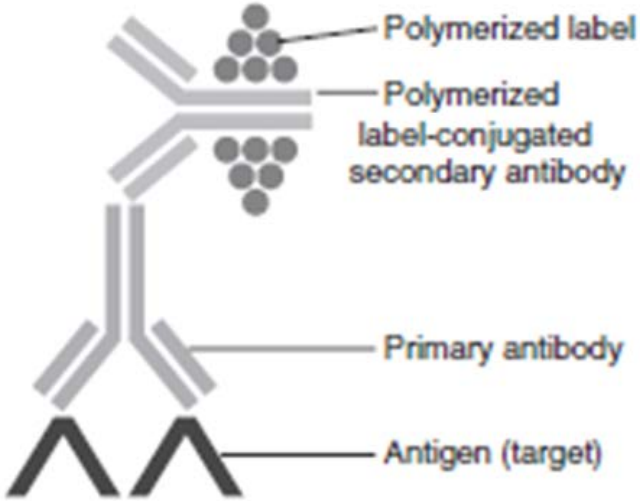
1. Renshaw S, “Immunohistochemistry: Methods Express”, Scion Publishing Ltd, Bloxham, UK, 2010

Πολυμερή

- Πολλαπλά μόρια ανίχνευσης στο δευτερογενές μέσω πολυμερούς:
  - Δεξτράνης (Dako), βραχέων αλύσων (Novocastra), Ventana, Biogenex, ImmPress (Vector Labs)

+ Δεύτερη υψηλότερη ευαισθη-σία
+ Μέθοδος 2 σταδίων μόνο
- Κόστος





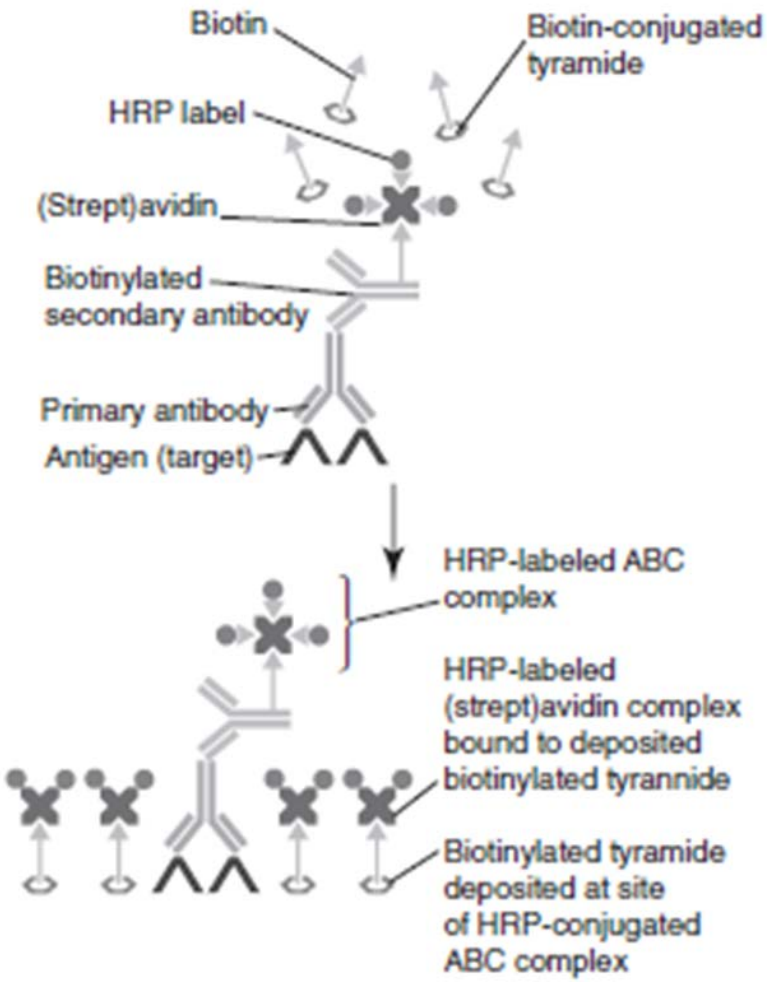
1. Renshaw S, “Immunohistochemistry: Methods Express”, Scion Publishing Ltd, Bloxham, UK, 2010

Catalyzed signal amplification (CSA)

- Όπως η LA/LSA
- Κατακρήμνιση συμπλόκου βιοτίνης - τυραμίδης. Σε δεύτερο στάδιο προστίθεται σύμπλοκο (στρεπτ-)αβιδίνης – HRP.

+ Έως 100 φορές περισσότερο σήμα.
+ Για αντιγόνα με χαμηλά επίπεδα ή ISH.

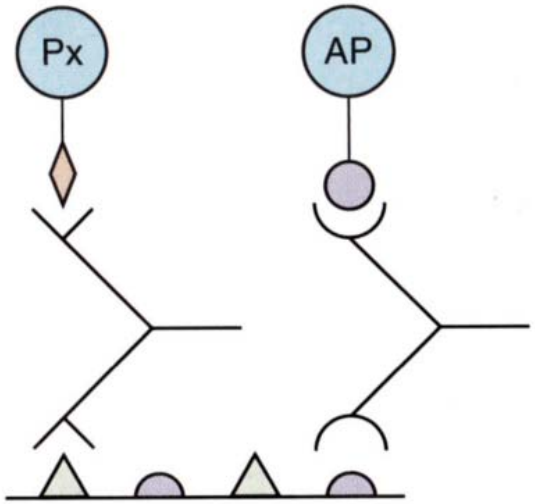
- Πολύπλοκη
- Συχνά υπόστρωμα

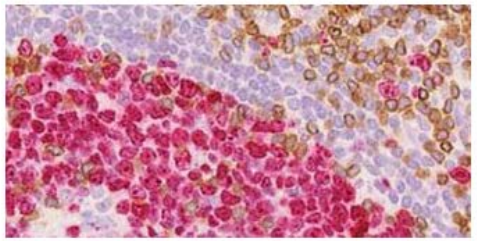


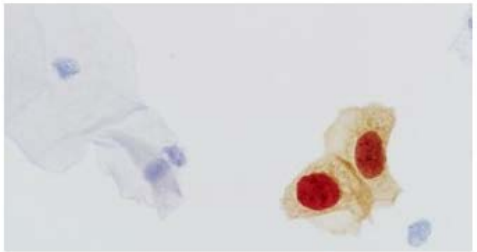
1. Renshaw S, “Immunohistochemistry: Methods Express”, Scion Publishing Ltd, Bloxham, UK, 2010

Διπλή Χρώση

- Πρωτογενή από διαφορετικά είδη ή διαφορετικής τάξης IgG.
- Δευτερογενή αντισώματα με υπεροξειδάση (Px) και φωσφατάση (AP).
- Χρώμα καφέ και κόκκινο.
- Επώαση πρωτογενών μπορεί να γίνει και ταυτόχρονα.
- Βέλτιστο αποτέλεσμα όταν τα αντιγόνα χρειάζονται ίδια προ-παρασκευή.







1. Dabbs D.J., “Diagnostic Immunohistochemistry” 3rd Ed., Elsevier 2010
2. Novocastra, “An introduction to decalsification”, Leica
3. Roche, “CINTECPlus”, Roche Diagnostics

Συγκριτικά

Μέθοδος	Ευαισθησία	Χρόνος	Κόστος
Άμεση	+	+++++	++
Έμμεση 2 σταδίων	++	++++	+
Έμμεση 3 σταδίων	+++	+++	+++
PAP/APAP	++++	+++	+++
ABC	+++++	+++	++
LA/LSAB	++++++	+++	+++++
Πολυμερή	++++++	++++	+++++
CSA	++++++++++	+	++++

Χρωμογόνα

- Οπτική εντόπιση της πρόσδεσης του αντισώματος πραγματοποιείται με χρήση χρωμογόνου.

Ένζυμο	Χρωμογόνο	Χρώμα	Διαλυτό
Υπεροξειδάση	DAB (Diaminobenzidine)	Καφέ	Όχι
	DAB με ενισχυτή	Μαύρο	Όχι
	AEC (3-Amino-9-ethyl- carbazole)	Κόκκινο	Αιθανόλη
	TMB (3,3,5,5-tetramethylbenzidine)	Μπλε	Όχι
Αλκαλική Φωσφατάση	Fast blue BB	Μπλε	Αιθανόλη
	Fast Red TR	Κόκκινο	Αιθανόλη
	Fuchsin	Κόκκινο	Όχι
	BIP-NBT	Μπλε	Όχι
Οξειδάση γλυκόζης	Tetrnitroblue tetrazolium (TNBT)	Μαύρο	Όχι
Immunogold	Ενίσχυση με άργυρο	Μαύρο	Όχι

Αντίχρωση

- Χρησιμοποιείται αιματοξυλίνη καθώς χρωματίζει τόσο τον πυρήνα και το κυτταρόπλασμα και επιπλέον διατηρεί τα μορφολογικά χαρακτηριστικά του πυρήνα.
- Αιματοξυλίνη Mayer (Harris’ περιέχει αιθανόλη που μπορεί να αλλοιώσει το χρωμογόνο)
- Πράσινο του μεθυλενίου σε σπάνιες ειδικές χρώσεις

Κάλυψη

- Οργανικά ή υδατικά. Επιλογή ανάλογα με το χρωμογόνο
  - DPX, Canada Balsam: Μόνιμα καλυπτικά, απαιτούν αφυδάτωση. Όχι για χρωμογόνα διαλυτά σε αιθανόλη (AEC, Fast Red, κ.α.).
  - Γλυκερόλη – Ζελατίνη: Κολλώδες, αλλά όχι μόνιμο (Ultramount, Aquamount, κ.α.)
  - Γλυκερόλη: Μόνο για παρατήρηση. Δεν σκληραίνει.
- Εναλλακτικά μπορεί να γίνει κάλυψη με υδατικό μέσο κάλυψης και είτε μονιμοποίηση με βερνίκι στα όρια της καλυπτρίδας ή αφότου στεγνώσει να γίνει κάλυψη με μόνιμο μέσο.

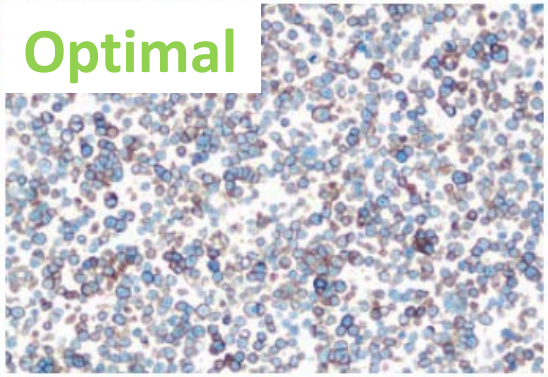
Ερμηνεία

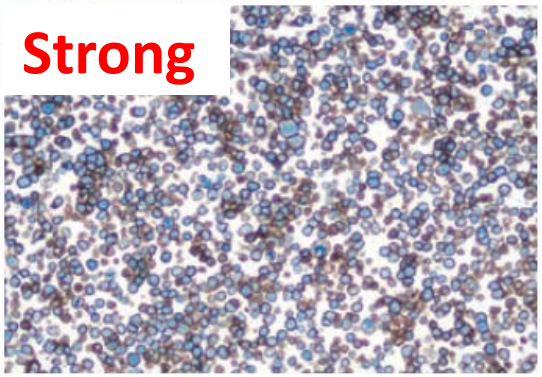
- Θετικό αποτέλεσμα χρώσης δεν σημαίνει πάντα επιτυχή ανίχνευση αντιγόνου, όπως και το αντίθετο.
- Επιλέγονται πολλαπλά αντισώματα (Panel) με μάρτυρες:
  - Αντισώματα που αναμένεται να έχουν θετικό αποτέλεσμα σε φυσιολογικά κύτταρα που υπάρχουν στο υλικό (π.χ. HBME1 στα φυσιολογικά μεσοθήλια ενός πλευριτικού υγρού).
  - Αντισώματα που αναμένονται να έχουν αρνητικό αποτέλεσμα σε φυσιολογικά κύτταρα του υλικού (π.χ. CD45 στα μεσοθήλια).
  - Βελτιστοποίηση αντισωμάτων σε άλλα υλικά ώστε να είναι γνωστές οι αραιώσεις και η προ-Παρασκευή που χρειάζεται το δείγμα.
  - Πρότυπες κυτταρικές σειρές για ημι-ποσοτικοποίηση (HER2- EGFR).

1. Dako, “immunohistochemical Staining Methods”, 5th ed, 2009, Dako
2. Canadian Association of Pathologists, “Best Practice Recommendations for Standardization of Immunohistochemistry Tests”, Am J Clin Pathol 2010;133:354-365

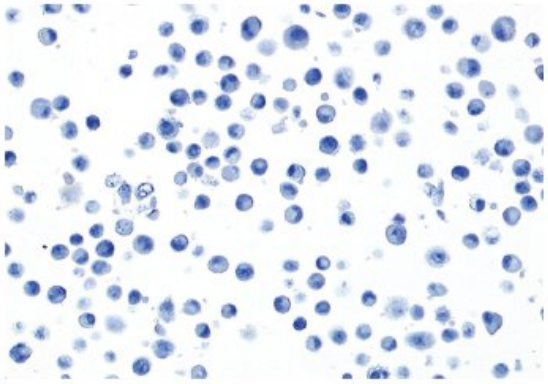
Πρότυπα - ημιποσοτική

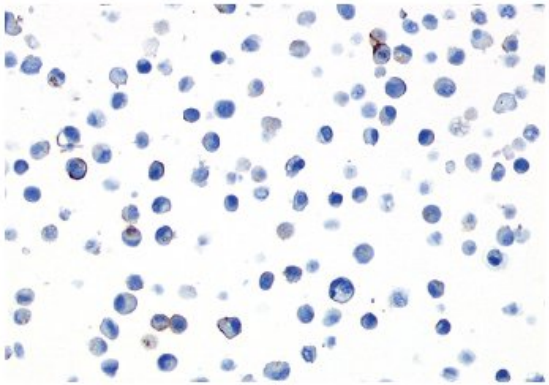
- HT29 Κυτταρική σειρά για EGFR

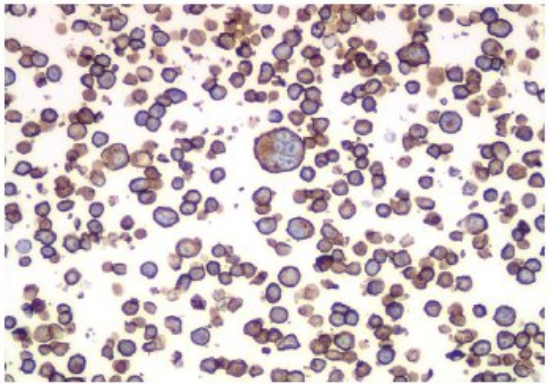




- Κυτταρικές σειρές για HER2 (MDA231-, MDA175+1, SKBR3 +3)







1. Dako, “immunohistochemical Staining Methods”, 5th ed, 2009, Dako

Ανοσοκυτταροχημεία

- Τρισδιάστατη δομή
- Μεμβρανικά ή κυτταροπλασματικά αντιγόνα
- Προσρόφηση σε ομάδες
- Εκφύλιση πολλών υλικών λόγω της φύσης συλλογής τους
- Συχνότερα απουσιάζει ενδογενής εσωτερικός μάρτυρας (π.χ. CD34 για βλάστες εκφράζεται σε ενδοθήλια αγγείων)
- Ατελής αιμόλυση και βλενόλυση προκαλεί αυξημένη μη-ειδική πρόσδεση
- Αιθανόλη και ακετόνη προκαλούν μείωση του μεγέθους των κυττάρων

Cell blocks

- Σχεδόν 2 διαστάσεις, ψευδοδομή
- Επιτρέπουν ευκολότερη εντόπιση μεμβρανικών πρωτεϊνών
- Επιτρέπουν παρασκευή μεγαλύτερου αριθμού πλακιδίων για χρώση

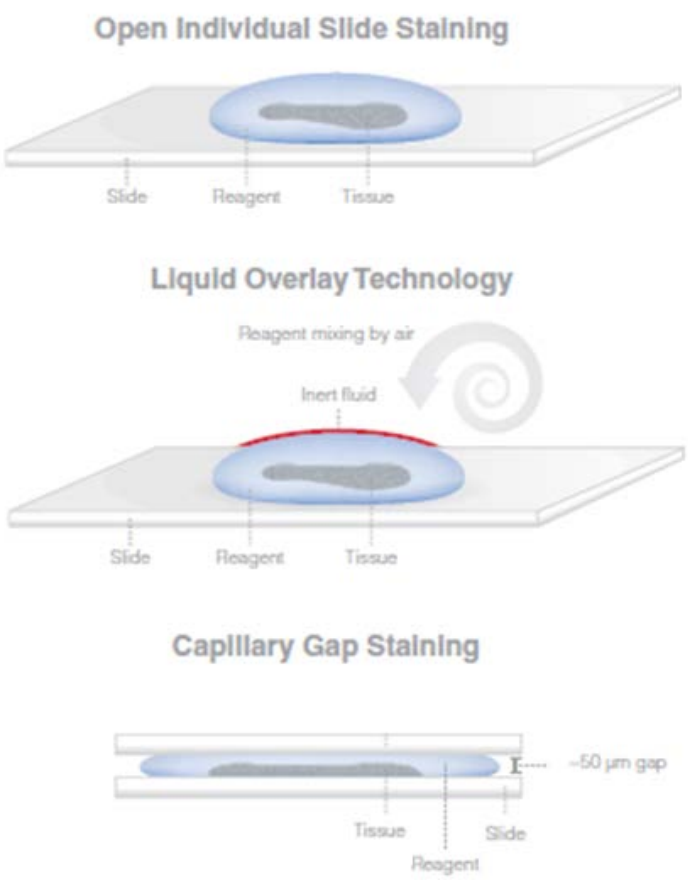
- Αύξηση χρόνου, καθώς ο εγκλεισμός, η κοπή και η αποπαραφίνωση επιβαρύνουν τη διαδικασία

Αυτοματοποίηση

- Παρόλη τη βελτίωση των συστημάτων ανίχνευσης, η άνοσος αποτελεί τεχνική με πολλαπλές επωάσεις και αρκετό hands-on χρόνο.
- Πληθώρα εμπορικών συστημάτων αυτόματης χρώσης (ICC, IHC, ISH).
- Τάση για ένταξη αποπαραφίνωσης και HIER στους δειγματοφορείς.

Αυτοματοποίηση

- Οι δειγματοφορείς διαμοιράζουν αντιδραστήρια. Δεν επιλέγουν αραιώσεις, pre-treatment και δυστυχώς δεν αξιολογούν τη χρώση!
- Ένταξη barcode, προ-αραιωμένων αντισωμάτων και κλειστών τύπων συστήματα προς αποφυγή λαθών και προτύπωση διαδικασιών.
- Διεθνώς μόνο για ανοσοϊστο-χημεία όμως.



1. Dako, “immunohistochemical Staining Methods”, 5th ed, 2009, Dako

Συμπερασματικά

- Η Ανοσοκυτταροχημεία – Ανοσοϊστοχημεία:
  1. Αποτελεί σημαντικότατη συμπληρωματική εξέταση για κάθε κυτταρολογικό ή παθολογοανατομικό εργαστήριο.
  2. Απαιτεί βασικές γνώσεις ανοσολογίας για επίλυση πιθανών προβλημάτων.
  3. Τεχνικά δεν παρουσιάζει σημαντικές προκλήσεις.
  4. Πρόκληση αποτελεί η επιλογή των κλώνων και βελτιστοποίηση των αραιώσεων.
  5. Είναι χρονοβόρα ως τεχνική καθώς χρειάζεται πολλαπλές επωάσεις
  6. Έχει σημαντικά οφέλη από την ένταξη αυτοματοποίησης
  7. Απαιτεί χρήση πάνελ, ενδογενών μαρτύρων και πρότυπων πλακιδίων ώστε να μπορεί να διασφαλιστεί η ποιότητα των χρώσεων

Εργαστήριο Διαγνωστικής Κυτταρολογίας, Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο «ΑΤΤΙΚΟΝ»

Βιβλία:

1. Dabbs D.J., “Diagnostic Immunohistochemistry” 3rd Ed., Elsevier 2010
2. Buchalow I., “Immunohistochemistry: Basics and Methods”, Springer, 2010 Δωρεάν
3. Dako, “immunohistochemical Staining Methods”, 5th ed, 2009, Δωρεάν

PPT

1. Søren Nielsen, “Immunohistochemistry, Review Of the Technical Test Approach”, CAP, 2010)

Καθηγητής Π. Καρακίτσος, Διευθυντής

Μ. Σταματάκη, Κυτταρολόγος
Α. .Ανοινος, Κυτταρολόγος

Δρ. Α. Σπάθης, Βιολόγος
Δρ. Χ. Κοτταρίδη, Βιολόγος

Σ. Καζίκα, Κυτταρολόγος, Τεχνολόγος
Α. Μουρτζίκου, Βιοχημικός
Ε. Άγα, Βιολόγος
Αμαλία Σταμουλακάτου, Τεχνολόγος
Κυριακή Κωνσταντινίδου, Τεχνολόγος